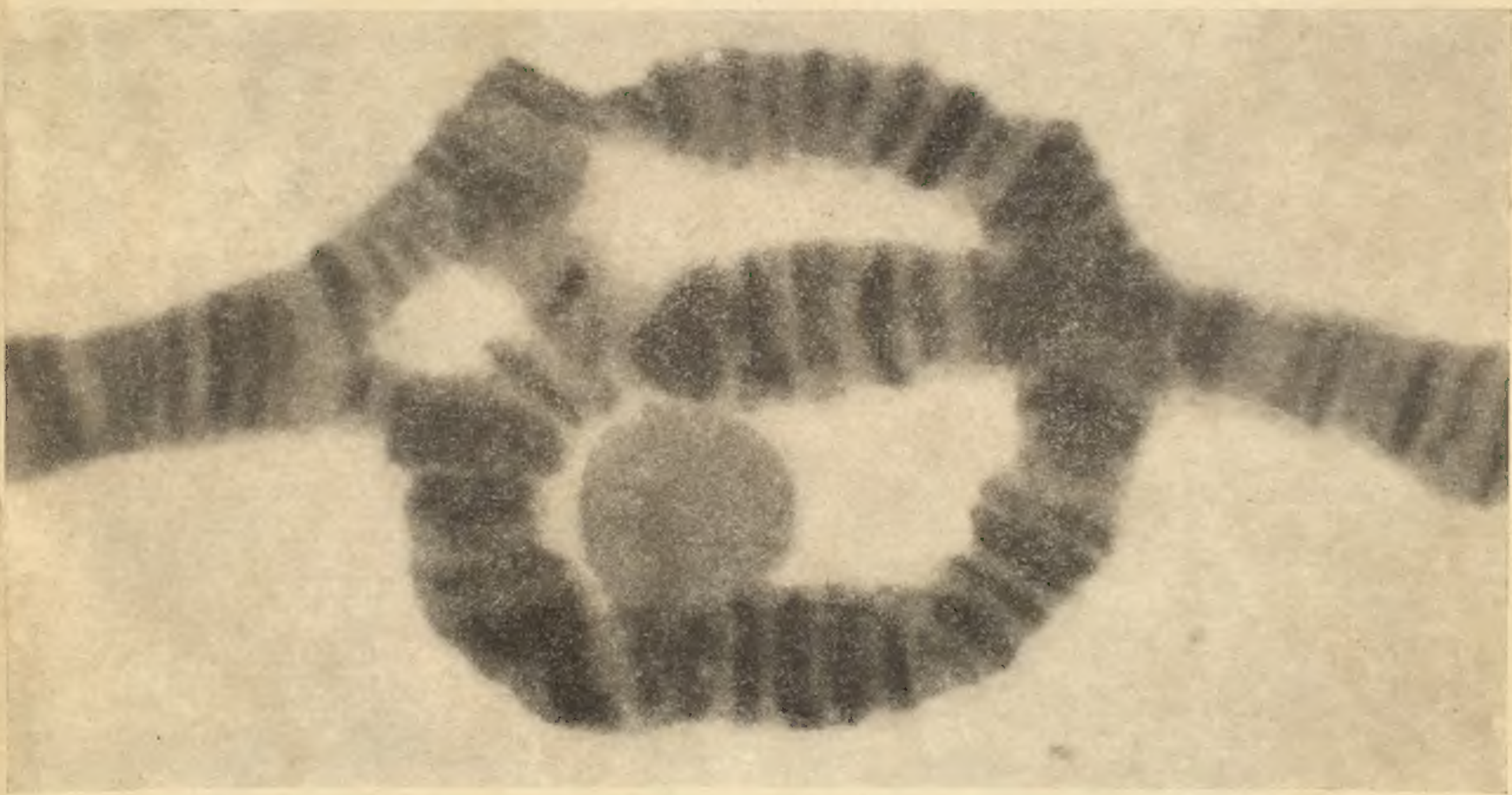


И. ГЕРШКОВИЧ



Генетика

И. ГЕРШКОВИЧ

Генетика

Книга И. Гершковича является одним из широко распространенных в США руководства по генетике, выдержавшим за короткое время два издания.

Материал книги расположен в строго логической последовательности. Особое внимание в ней уделено молекулярным аспектам генетики. Так, из 42 глав руководства 28 посвящены биохимико-молекулярным разделам этой науки. Удачен вопросник, помещенный в конце каждой главы, который помогает лучше усвоить и глубже продумать приведенный в книге учебный материал. Руководство иллюстрировано большим количеством фотографий и схем.

Особую ценность представляет собрание речей генетиков — лауреатов Нобелевской премии. Содержание речей дает хорошее представление о достижениях современной генетики и о тех путях, которые привели к этим достижениям.

THE HERBERT

Genetics



THE HERBERT
THE HERBERT
THE HERBERT

THE HERBERT
THE HERBERT
THE HERBERT

IRWIN HERSKOWITZ

Genetics

HUNTER COLLEGE,
THE CITY UNIVERSITY
OF NEW YORK

Second Edition

LITTLE, BROWN AND COMPANY
BOSTON AND TORONTO 1965

И. ГЕРШКОВИЧ

Генетика

ПЕРЕВОД С АНГЛИЙСКОГО

В. А. ГВОЗДЕВА, Ю. Н. ЗОГРАФА,
Т. С. ИЛЬИНОЙ и В. Г. НИКИФОРОВА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ И С ПРЕДИСЛОВИЕМ

профессора Н. И. ШАПИРО

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

МОСКВА 1968

Генетика. И. Гершкович. «Наука», 1968, 1—678

МАТЕРИАЛ РУКОВОДСТВА ОХВАТЫВАЕТ ПРАКТИЧЕСКИ ВСЕ ПРОБЛЕМЫ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ ГЕНЕТИКИ. КНИГА СОЧЕТАЕТ ИЗЛОЖЕНИЕ ТРАДИЦИОННЫХ, КЛАССИЧЕСКИХ РАЗДЕЛОВ ГЕНЕТИКИ (МЕНДЕЛИЗМ, ХРОМОСОМНАЯ ТЕОРИЯ НАСЛЕДСТВЕННОСТИ) С БИОХИМИЧЕСКОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКОЙ.

В ПОСЛЕДНЕМ РАЗДЕЛЕ КНИГИ ДАНЫ ТЕКСТЫ ЛЕКЦИЙ ГЕНЕТИКОВ — ЛАУРЕАТОВ НОБЕЛЕВСКИХ ПРЕМИЙ, В КОТОРЫХ АВТОРЫ ОСВЕЩАЮТ НЕ ТОЛЬКО КОНКРЕТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ СВОИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, НО И ПОЛОЖЕНИЕ ГЕНЕТИКИ КАК НАУКИ В ЦЕЛОМ, ВЫЯВЛЯЮТ УЗЛОВЫЕ ВОПРОСЫ ЭТОЙ НАУКИ И ОЦЕНИВАЮТ РАЗНЫЕ ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ.

В КНИГЕ МНОГО ОРИГИНАЛЬНЫХ ИЛЛЮСТРАЦИЙ, К КАЖДОЙ ГЛАВЕ ПРИЛОЖЕН ВОПРОСНИК, ОБЛЕГЧАЮЩИЙ УСВОЕНИЕ МАТЕРИАЛА.

РУКОВОДСТВО РАССЧИТАНО НА ШИРОКИЙ КРУГ ГЕНЕТИКОВ — НАУЧНЫХ РАБОТНИКОВ, АСПИРАНТОВ, СТУДЕНТОВ И БИОЛОГОВ ВСЕХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ.

ИЛЛЮСТРАЦИЙ 286. ТАБЛИЦ 59.

Издание подготовлено научным советом
по проблемам генетики и селекции Академии наук СССР

ОПЕЧАТКИ

| Страница | Строка | Напечатано | Должно быть |
|------------|---------|------------|------------------|
| 220 | 19 стр. | 0,00001 | $\sqrt{0,00001}$ |
| 220 | | | |
| Табл. 15—3 | 3 св. | q_2 | q^2 |

Гершкович. Генетика

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|-----|
| ПРЕДИСЛОВИЕ | 5 |
| 1 ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ И МИТОЗ | 9 |
| 2 МЕЙОЗ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ХРОМОСОМ | 23 |
| 3 РАСЩЕПЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ | 38 |
| 4 НЕЗАВИСИМАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ | 49 |
| 5 МНОЖЕСТВЕННЫЕ АЛЛЕЛИ; МУЛЬТИГЕННЫЕ ПРИЗНАКИ | 64 |
| 6 ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ | 76 |
| 7 ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ И СЦЕПЛЕННЫЕ С ПОЛОМ ГЕНЫ | 97 |
| 8 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА | 110 |
| 9 СЦЕПЛЕНИЕ И ПЕРЕКРЕСТ МЕЖДУ ГЕНАМИ | 125 |
| 10 РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ, КРОССОВЕРНЫЕ КАРТЫ | 141 |
| 11 ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛА ХРОМОСОМ | 162 |
| 12 СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМ | 177 |
| 13 СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМ, ВЫЗВАННЫЕ ОБЛУЧЕНИЕМ | 193 |
| 14 ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ | 203 |
| 15 ГЕНОФОНД; ФАКТОРЫ РАВНОВЕСИЯ | 216 |

| | | |
|----|--|-----|
| 16 | ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОТЯГОЩЕННОСТЬ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ПОПУЛЯЦИЮ | 231 |
| 17 | ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ, ВСТРЕЧАЮЩИ- ЕСЯ В ПРИРОДЕ | 244 |
| 18 | РАСЫ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ВИДОВ | 257 |
| 19 | ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ГЕНОВ | 268 |
| 20 | ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ ДНК IN VIVO | 280 |
| 21 | РЕПЛИКАЦИЯ ДНК IN VITRO | 292 |
| 22 | КЛОНЫ. ТРАНСФОРМАЦИЯ. РЕКОМБИНАЦИЯ НИТЕЙ IN VITRO | 306 |
| 23 | БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ И КОНЪЮГАЦИЯ | 320 |
| 24 | ЭПИСОМА F | 331 |
| 25 | ТРАНСДУКЦИЯ | 343 |
| 26 | БАКТЕРИОФАГ. РЕКОМБИНАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕ- СКИЕ КАРТЫ | 353 |
| 27 | БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭПИСОМЫ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ | 368 |
| 28 | РНК КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ | 377 |
| 29 | ВНЕЯДЕРНЫЕ ГЕНЫ | 383 |
| 30 | ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МУТИРОВАНИЯ | 396 |
| 31 | МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МУТАЦИЙ | 404 |
| 32 | ДЕЙСТВИЕ ГЕНА И ПОЛИПЕПТИДЫ | 417 |
| 33 | ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ И РНК | 436 |

| | | |
|-----|--|-----|
| III | ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОДИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ | 449 |
| 35 | РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ГЕНОВ | 462 |
| 36 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ. ОПЕРОНЫ | 470 |
| 37 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — СИСТЕМА ГЕННОГО КОНТРОЛЯ У КУКУРУЗЫ | 477 |
| 38 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ У ДРОЗОФИЛЫ | 485 |
| 39 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ | 495 |
| 40 | МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ У ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ | 503 |
| 41 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — РОСТ, ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И РАЗВИТИЕ | 511 |
| 42 | ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА | 520 |
| | ДОПОЛНЕНИЕ И ПРИЛОЖЕНИЯ | 529 |
| | ДОПОЛНЕНИЕ | |
| | ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ СВЕДЕНИЯ ПО БИОМЕТРИИ | 530 |
| | ПРИЛОЖЕНИЯ | |
| I | ЧАСТЬ ПИСЬМА ГРЕГОРА МЕНДЕЛЯ НЭГЕЛИ | 554 |
| II | Т. Морган. ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ | 559 |
| III | Г. Меллер. ОБРАЗОВАНИЕ МУТАЦИЙ | 562 |
| IV | М. Вилкинс. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ | 576 |
| V | А. Корнберг. БИОСИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ | 591 |

VI

Джордж В. Бидл. ГЕНЫ И ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У НЕЙРОСПОРЫ

602

VII

Э. Л. Татум. ИСТОРИЯ ОДНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

611

VIII

Джошуа Ледерберг. ОБЗОР ГЕНЕТИКИ

619

IX

Дж. Д. Уотсон. РОЛЬ РНК В СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

635

X

Ф. Крик. К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОДЕ

653

XI

Ф. Жакоб. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

660

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

675

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

699

ПРЕДИСЛОВИЕ

Хорошо известно, что написание доброкачественного вузовского учебника или руководства — весьма трудное и сложное дело. При его создании приходится заботиться не только об изложении предмета на современном научном уровне, но и уделять большое внимание форме подачи материала, последовательности изложения, его наглядности. Успех учебника, несомненно, определяется тем, насколько гармонично представлены в книге эти качества. А поскольку выполнение такой синтетической задачи чрезвычайно сложно, можно назвать относительно мало общепризнанных учебных руководств для вузов даже для «устоявшихся» дисциплин, имеющих прочные традиции в издании такого рода книг.

Все эти трудности, естественно, неизмеримо возрастают, когда речь идет о руководстве по стремительно развивающейся дисциплине, в которой вновь полученный материал по своему объему и значению конкурирует со всем накопленным ранее, а написание учебника происходит непосредственно в этот бурный период времени. Подобная ситуация имеет место сейчас при издании учебника по генетике.

Пожалуй, ни одна биологическая дисциплина не пережила за последние два десятилетия и не продолжает переживать такое бурное развитие, как генетика. Прогресс в изучении наследственности столь велик, что позволил перейти от организменного, клеточного и субклеточного уровней рассмотрения основ генетики на молекулярный. Этот переход обязан многим факторам и, в первую очередь, введению в круг генетически изучаемых объектов микроорганизмов, а также тесному контакту генетики с такими дисциплинами, как физика, химия и биохимия. Удачный выбор объектов исследования с одновременной биохимизацией генетики позволили выявить роль ДНК в наследственности, расшифровать ее строение, открыть код наследственной информации и первичные пути его реализации, а также установить целый ряд других фундаментальных закономерностей.

Но прогресс генетики не повлек за собой отрицания или хотя бы умаления значения того, что было установлено в этой науке ранее. Более того, только на основе уже накопленного материала, а именно на основе хромосомной теории наследственности, оказалось возможным сформулировать современные представления о молекулярном строении «вещества наследственности» — ДНК, молекулярной природе основной единицы наследственности — гена, о природе генетической регуляции развития признаков организма и т. д. и т. п. Таким образом, возводимое здание современной

генетики есть как бы единый архитектурный ансамбль, фундаментом которому служит хромосомная теория наследственности.

В связи с таким бурным развитием генетики естественно, что поток научной информации в виде статей и книг столь велик, что его использование представляет большую сложность. Этот поток буквально захлестывает исследователей-генетиков. Вместе с тем, поскольку здание генетики еще далеко не достроено, то нет особых оснований предполагать, что количество вновь получаемой информации будет в ближайшее время уменьшаться. Поэтому написание вузовского руководства по генетике представляет собой задачу особой трудности. Вместе с тем, эта задача не может быть отложена до конца «реконструктивного» периода.

Как строить современный учебник или руководство по генетике, предназначенное для университетов? Давать ли в нем лишь хорошо устоявшиеся положения или не ограничиваться только ими? Вводить ли в руководство те разделы генетики, с которых еще не сняты «леса строек»? Если вводить, то где та грань, за пределы которой нежелательно было бы переступать? Все эти и аналогичные вопросы требуют быстрого ответа. Пока однозначного ответа на них нет. Вот почему написание в настоящее время учебника по генетике — это своеобразный поиск гармоничного сочетания основных устоявшихся положений с информацией о том бурно развивающемся новом, без чего нет и не может быть современного учебного руководства по генетике. Существует и другая трудность при написании такого руководства: нельзя беспредельно увеличивать его объем. Отсюда следует какие-то разделы излагать более схематично, чем это делалось ранее, уступая место новому; что-то из курса вообще должно быть перенесено в программу средней школы. Мера всего этого достаточно неясна. Здесь пока еще нет никаких канонов. Поэтому написание нового учебного руководства по генетике есть сложный и трудный педагогический поиск. Только опыт использования учебников и руководств, по-разному решающих поставленные выше вопросы, позволит найти на них правильные ответы. Очевидно, что для накопления такого рода опыта рационально использовать, наряду с отечественными книгами, и иностранные руководства.

В предлагаемом вниманию читателей переводе американского руководства по генетике, написанного И. Гершковичем, явное предпочтение отдано изложению молекулярных аспектов этой науки. Так, из 42 глав книги лишь около половины излагают традиционный материал курса классической генетики, а остальные посвящены молекулярному — биохимическому уровню рассмотрения самых различных проблем генетики. Изложение молекулярной генетики, основанное на изучении микроорганизмов, является несомненно сильной стороной руководства. Положительно должна быть оценена и строго логическая последовательность изложения материала. Это касается как его распределения по главам, так и внутреннего построения последних. Гершкович нарочито подчеркивает логику развития основных генетических представлений, подчас формулируя последние как самостоятельные логические задачи. Такой подход достаточно выражен, начиная с изложения механизма, определяющего

передачу признаков по наследству, и кончая обсуждением возможных путей регуляции действия генов. Автор не боится ввести читателя в лабораторию генетической науки сегодняшнего дня, где далеко не все еще решено и куда новые важные сведения поступают необычайно быстро. В этом отношении книга Гершковича вполне современна. Но современность книги, хотя это может и показаться странным, повлекла за собой ее недостатки.

Во-первых, в книгу вошли сведения по молекулярной биологии, которые были справедливы к моменту ее написания, а к сегодняшнему дню уже успели устареть и стали недостаточно полно отображать современные представления. Это прежде всего касается некоторых сторон синтеза белка и установления генетического кода (гл. 33, 34), а также вопроса о регуляции действия гена (гл. 36). Во-вторых, очевидно из-за недостатка места в книге оказались слабо освещены такие кардинальные вопросы генетики, как генетика популяций, генетические основы эволюции и селекции, наследование количественных признаков и некоторые другие. Это та цена, которую заплатил автор за достаточно подробное и глубокое изложение молекулярных аспектов генетики. Цена, очевидно неоправданная для учебника, но которую можно понять, рассматривая книгу Гершковича как руководство.

Методической удачей книги является вопросник, приводимый в конце каждой главы. Он преследует цель не столько облегчить школьное освоение изложенного материала, сколько заставить читателя глубже над ним задуматься и использовать полученные знания для обсуждения смежных вопросов. Особенно существенно, что эти вопросы ориентируют читателя на самостоятельное продумывание генетического содержания книги.

Книга богато иллюстрирована, в ней, помимо многочисленных в основном остроумных и оригинальных схем, рисунков и таблиц, даны фотографии ряда видных генетиков. В связи с последним нельзя не отметить как недостаток книги избирательность подбора фотографий — в подавляющем большинстве это американские исследователи. Неоправданный американизм в еще большей степени выявляется при цитировании работ как в тексте книги, так и в списках литературы, приводимых в конце каждой главы. Здесь Гершкович не избежал распространенной среди американских авторов болезни — необъективного выбора работ для цитирования и, в частности, забвения советских ученых. Так, в книге не упоминается имя Н. И. Вавилова ¹ — автора, открывшего закон гомологических рядов наследственной изменчивости. Отсутствуют ссылки на С. С. Четверикова ², классические исследования которого положили начало изучению генетики популяций и сыграли исключительную роль в создании генетической теории эволюции. Нет в книге и упоминания работ А. С. Серебровского ³,

¹ Н. И. Вавилов. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Сб. «Теоретические основы селекции растений», т. 1. М.—Л., Сельхозгиз, 1935.

² С. С. Четвериков. О некоторых моментах эволюционного процесса с точки зрения современной генетики.— Бюлл. МОИП; 1965, т. 70, вып. 4, 33.

³ А. С. Серебровский. Влияние гена *rugle* на кроссинговер между *black* и *cinnabar* у *Drosophila melanogaster*.— Журнал эксперим. биологии, 1926, серия А.2, вып. 1. Е г о ж е. Исследование ступенчатого аллеломорфизма.— Журнал эксперим. биологии, 1930, т. 6, вып. 2, 61.

явившихся первым реальным шагом на пути создания современного представления о тонкой структуре гена. Отсутствие изложения как этих исследований, так и некоторых других важнейших работ несомненно обедняет книгу.

Отдельно необходимо остановиться на приложении к книге, составленном из речей генетиков — нобелевских лауреатов, произнесенных при вручении им премий. Мысль собрать воедино все эти речи, предпослав им выдержку из письма Менделя к Негели, является весьма ценной¹. Речи лауреатов представляют несомненный интерес прежде всего потому, что читатель получает в них ценнейшую научную информацию в достаточно доступной форме из первых рук — от первоклассных ученых, внесших большой вклад в развитие генетики. Речи, собранные вместе, представляют как бы концентрат открытий, характеризующих современное состояние учения о наследственности.

Оценивая книгу Гершковича в целом, мы не сомневаемся, что, несмотря на ряд недостатков, она будет полезна не только как руководство для студентов и аспирантов, специализирующихся в генетике, но и для широкого круга биологов, интересующихся общими вопросами своей науки.

Н. И. Шапиро

¹ Настоящее издание дополнено речью нобелевского лауреата Жакоба, произнесенной уже после выхода в свет книги Гершковича в Америке.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ И МИТОЗ

Каждый из нас несомненно осознает себя существом того же рода, что и его родители. Они произвели на свет нового человека, а не растение, не рыбу и не птицу. Начнем поэтому с предположения о том, что существует некий внутренний фактор, который заставляет людей рождать именно людей. Назовем этот врожденный фактор, обеспечивающий происхождение подобного от подобного, *генетическим фактором*. Так как каждое растение или животное дает потомство своего же вида, можно сделать более общее заключение, предположив, что каждый вид организмов обладает таким внутренним генетическим фактором. Но при этом необходимо также признать, что генетические факторы собаки, яблони и человека должны как-то отличаться друг от друга для того, чтобы образовывать в качестве конечного продукта столь различные организмы.

Помимо основных видовых черт сходства каждая особь по ряду признаков похожа, а по ряду признаков отличается от своих родителей. С чем это связано? Вес родителей и детей в сравнимом возрасте отличается меньше в том случае, когда калорийность их пищи одинакова, и больше, когда они потребляют разное количество калорий. Отсюда очевидно, что внешние условия, в которых живут родители и дети, могут в некоторых случаях быть причиной сходства и различий между ними. Но все ли черты сходства и различий между людьми вызываются внешними условиями, или в их возникновении играет роль генетический фактор, который, как мы предположили, отвечает за порождение подобного подобным?

Для ответа на этот вопрос полезно рассмотреть результаты ряда исследований, проведенных с бобовыми растениями Иоганнсеном. Тот вид бобовых растений, о котором идет речь, размножается половым путем, причем одно и то же растение выполняет функции родителей как мужского, так и женского пола. Предположим пока, что *генетический фактор передается от родителя к потомку, причем передается без изменения*. Генетический фактор, очевидно, имеет материальную основу и, как все остальные материальные объекты, должен обладать химическими и физическими свойствами. Мы приходим таким образом к необходимости постулировать существование *генетического материала*.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Возьмем одно бобовое зерно. Когда выросшее из него растение даст зерна (рис. 1—1,А), оказывается, что они отличаются друг от друга по величине: некоторые из них очень мелкие, другие просто мелкие, третьи средней величины. Согласно нашей гипотезе, все эти зерна обладают одинаковым генетическим материалом, имеют одинаковую генетическую конституцию, или *генотип*. Различия в размере зерен проще всего объяснить разницей во внешних условиях во время их формирования. Это предположение можно проверить, посадив все эти зерна и изучив размеры зерен, которые дает каждое растение. При этом оказывается, что каждое зерно, независимо от собственных размеров, дает потомство очень мелких, просто мелких и средних зерен. Этот опыт можно повторять из поколения в поколение с неизменным результатом. Такую последовательность поколений, все члены которой обладают одинаковым генотипом, можно назвать *чистой*

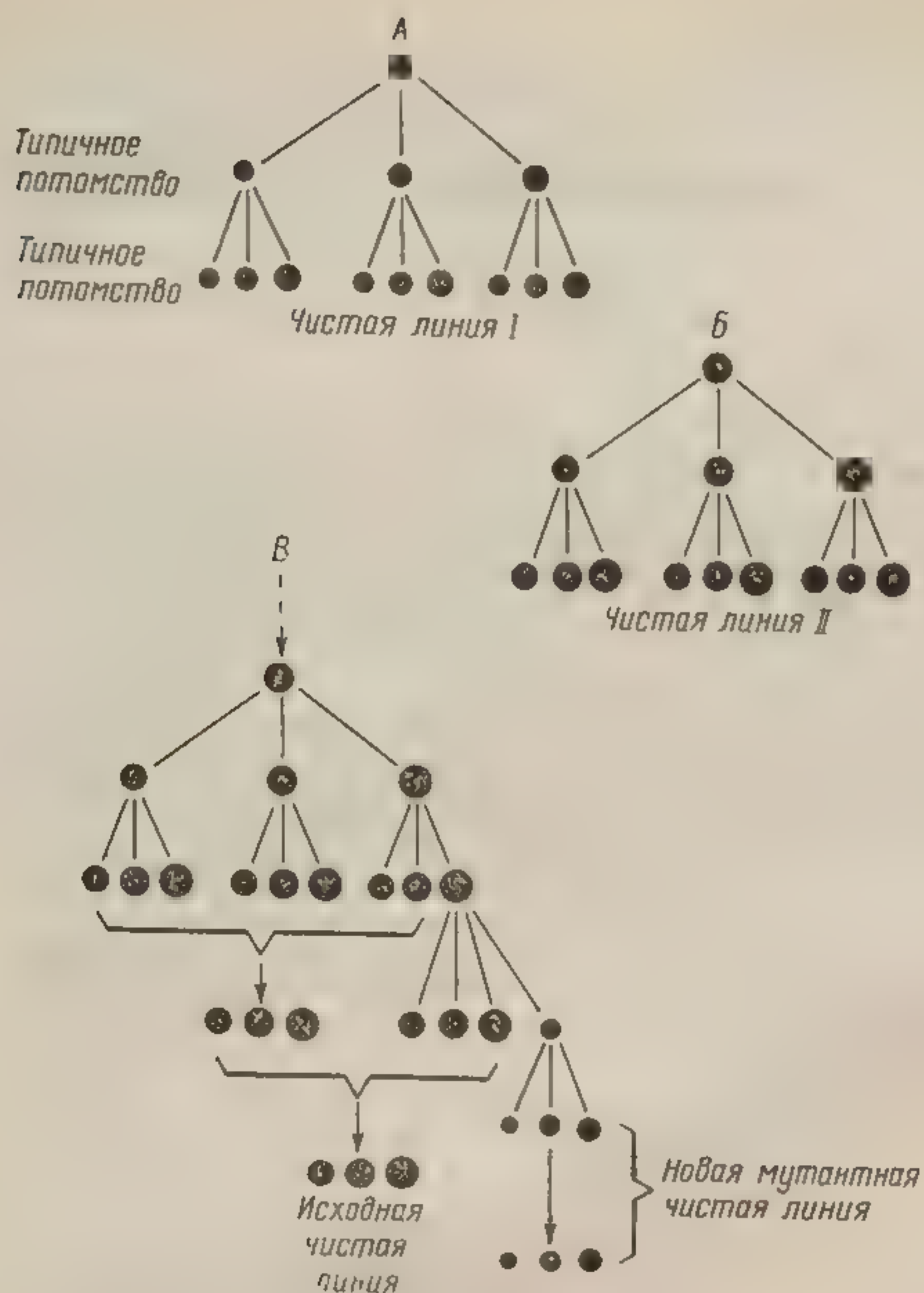


РИС. 1-1.

Относительные размеры зерен при самоопылении бобов

линией. Проявление генотипа в виде признаков (в нашем случае размер зерен) называют *фенотипом*. Различия во внешних условиях могут привести к тому, что один и тот же генотип образует разнообразные фенотипы, и мы можем заключить, что различия между зернами в чистой линии вызваны внешними условиями, а не различиями в генотипе.

Возьмем теперь другое зерно, которое принадлежит к тому же виду бобов, что и первое, но дает потомство очень крупных, просто крупных и средних зерен (рис. 1—1, B). Так как все эти зерна в свою очередь дают потомство с такими же вариациями фенотипа, то очевидно, что мы имеем дело с другой, отличной от первой чистой линией, в которой фенотипическая изменчивость определяется внешними условиями.

Как можно объяснить различия между этими двумя чистыми линиями, одна из которых дает определенное количество очень мелких и просто мелких зерен, а другая — очень крупных и просто крупных зерен? Поскольку все растения росли в одинаковых условиях, фенотипические различия нельзя приписать различию во внешней среде. Следовательно, они должны быть связаны с различиями в генотипе. Таким образом, мы должны заключить, что генетический материал этих двух чистых линий отличается друг от друга. Как же объяснить тот факт, что некоторые зерна в обеих генетически отличающихся чистых линиях похожи друг на друга: обладают средним размером? Очевидно, разные генотипы дают одинаковый фенотип под влиянием внешних условий.

Как уже говорилось, при одинаковых внешних условиях средний размер зерен в чистой линии остается постоянным независимо от размера

того зерна, из которого они были выращены. Так, в первой чистой линии бобовые зерна — потомки обладают одним и тем же средним размером независимо от того, выросли ли они из очень мелкого или же из среднего родительского зерна. Точно так же во второй линии средний размер зерен оказывается одинаковым и в том случае, когда родительское зерно обладало средними размерами, и когда оно было очень крупным. Другими словами, как и следовало ожидать на основании гипотезы о генетической идентичности всех членов чистой линии, в пределах такой линии бессмысленно проводить отбор по размеру зерен.

При проведении описанных опытов с бобами прилагались все усилия к тому, чтобы внешние условия были одинаковы. Это не значит, что они не менялись. Внешняя среда менялась, но примерно в одном и том же направлении и в одной и той же степени для всех подопытных растений. В рассматриваемой конкретной работе фенотипическая изменчивость, связанная с колебаниями внешних условий, не оказалась столь большой, чтобы полностью замаскировать фенотипический эффект генетического различия. Однако в каждом произвольно выбранном случае нельзя заранее предсказать, в какой степени каждый данный конкретный фенотип обусловлен влиянием генотипа и в какой — внешних условий. Таким образом, теоретически как фенотипическое сходство, так и фенотипическое различие двух особей одного вида могут возникнуть в результате любой из четырех приведенных ниже комбинаций, проиллюстрированных конкретными примерами:

1. Одинаковые генотипы при одинаковых внешних условиях

Фенотипическое различие: одно мелкое и одно среднее бобовое зерно из одной чистой линии.

Фенотипическое сходство: два мелких бобовых зерна из одной чистой линии.

2. Различные генотипы при одинаковых внешних условиях

Фенотипическое различие: одно мелкое и одно крупное бобовое зерно из генетически отличающихся чистых линий.

Фенотипическое сходство: два средних бобовых зерна из генетически отличающихся чистых линий.

3. Одинаковые генотипы при разных внешних условиях

Фенотипическое различие: бобовое растение, выращенное на свету, окрашено в зеленый цвет, а выращенное в темноте — в белый цвет, хотя оба растения принадлежат к одной чистой линии.

Фенотипическое сходство: если два кролика принадлежат к определенной чистой линии (генетически черных кроликов), то у обоих будет черная шкурка, хотя один рос при высокой температуре, а другой — при низкой.

4. Разные генотипы при разных внешних условиях

Фенотипическое различие. Кролик генетически черной линии, выращенный в холодном климате, обладает черным мехом, а кролик гималайской линии, выращенный при умеренных температурах, имеет характерную «гималайскую» окраску, т. е. белую за исключением лап, хвоста, морды и ушей черного цвета (рис. 1—2).

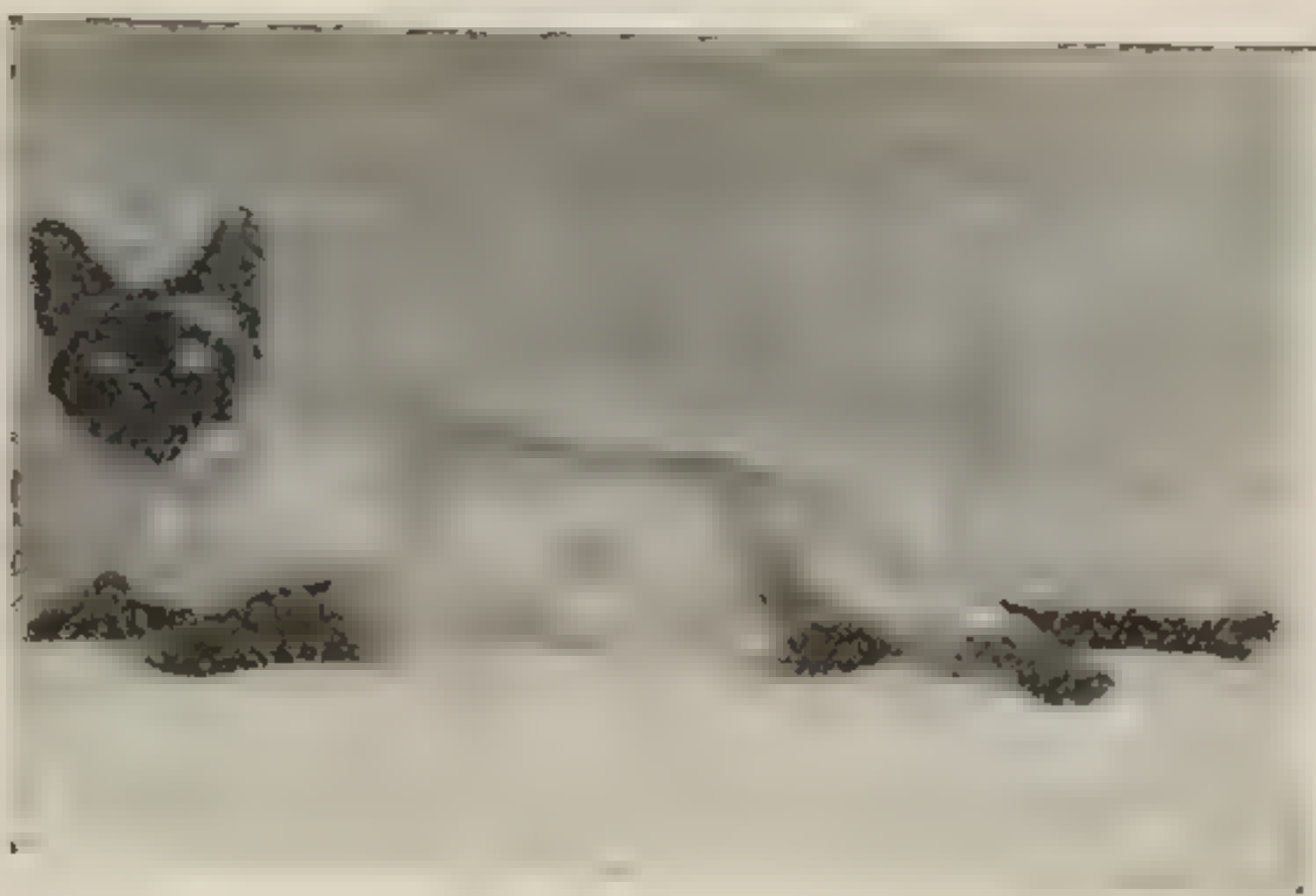


РИС. 1-2.

Сиамский кот, выросший при умеренных температурах, обладает такой же пигментацией, что и гималайский кролик

Фенотипическое сходство. Кролик генетически черной линии, выращенный при умеренных температурах, и кролик гималайской линии, выращенный при низких температурах, обладают черным мехом.

Последний пример показывает, что генотипически отличающиеся особи, которые фенотипически различны при одних внешних условиях, при других условиях могут оказаться фенотипически сходными. Полностью черный гималайский кролик называется *фенокопией* генетически черного кролика. Лица, страдающие наследственным диабетом, но принимающие инсулин, — это фенокопии генетически нормальных людей, не принимающих инсулина. Если беременная женщина принимает талидомид, то генетически нормальные эмбрионы развиваются в фенокопии генетически ненормальных особей, у которых нет всех четырех или большинства конечностей. Таким образом и нормальные, и патологические фенотипы могут быть фенокопиями.

Пример с окраской меха кроликов поучителен и в другом отношении. Генетически черный кролик имеет черную шкуру при любой температуре, если только последняя не летальна. Для этого генотипа, по-видимому, не существует вариаций проявления фенотипа в зависимости от изменений температуры. Однако, как уже указывалось, в гималайской линии дело обстоит иначе. Если выращивать гималайских кроликов при очень высокой температуре, их шкурка оказывается совершенно белой. В этом случае *амплитуда фенотипической вариации (норма реакции генотипа)* относительно велика: с повышением температуры окраска изменяется от совершенно черной через гималайскую до совершенно белой.

Теперь мы можем ответить на вопрос о природе сходства и различий между потомками и между ними и их родителями. Распространяя принципы, только что описанные для бобов и кроликов, на все остальные организмы, включая человека, можно сделать заключение, что генетический материал отличается не только у разных видов организмов, но может отличаться и у разных организмов одного и того же вида. И при одинаковом, и при разном генотипе между организмами может наблюдаться фенотипическое сходство, а фенотипические отличия организмов могут быть, а могут и не быть обусловлены генетическими различиями.

Признав существование *генетических различий как внутри видов, так и между видами*, можно спросить, как возникают эти генетические различия? Если выращивать чистую линию бобов с крупными зернами в течение многих поколений, то в виде редкого исключения попадают очень мелкие зерна, дающие потомство зерен, размер которых варьирует от мельчайшего до мелкого и которые явно образуют новую чистую линию (рис. 1—1,В). Очевидно, что генетический материал чистой линии бобов с крупными зернами как-то изменился, перешел в другую, передающуюся по наследству форму, которая теперь вызывает образование в среднем очень мелких бобов. Такое изменение генотипа, передающееся потомству, можно приписать процессу, именуемому *мутацией*. Результатом мутации

является *мутант*. Этот термин можно относить как к генотипу, так и к фенотипу новой особи.

Подобно тому как легко приписать различия между собаками и кошками генетическим различиям, часто бывает просто показать, что определенные различия между линиями одного и того же вида имеют генетическую природу. Существует много разновидностей или пород голубей, собак, крупного рогатого скота и других домашних животных, которые отличаются друг от друга по фенотипу. Многие из таких различий объясняются различием генотипов. Это доказывается сохранением фенотипических различий даже после того, как разные породы в течение многих поколений выращивались в одинаковых условиях. Обнаруженные таким образом внутри вида неодинаковые генотипы обладают чрезвычайным разнообразием. Существование такой генетической неоднородности всегда следует иметь в виду, если мы хотим больше узнать о природе генетического материала.

Чтобы больше узнать о генетическом материале, необходимо подробнее изучить материальные компоненты, из которых построен организм, особенно компоненты, передаваемые от родителей к потомству. Большая часть организмов состоит из строительных блоков (обычно микроскопических), которые называются *клетками*, а также из веществ, вырабатываемых клетками. В начале своего существования подобный организм представляет собой единичную клетку, или две клетки, слившиеся в одну, или же группу неслившихся клеток. В любом случае эти клетки происходят от родительских особей и служат звеном или мостиком, обеспечивающим преемственность между поколениями. В тех случаях, когда новый организм начинает свое существование в виде одной или *нескольких не слившихся* клеток, полученных от одного родителя, происходит *бесполое* размножение. Если же потомок получает клетки от двух родителей, имеет место *половое* размножение. При половом размножении две зрелые половые клетки, или *гаметы*, в процессе оплодотворения сливаются в одну новую клетку — *зиготу*, которая дает начало новому организму. У высших животных женская гамета называется *яйцеклеткой*, мужская — *сперматозоидом*, а зигота — *оплодотворенной яйцеклеткой*. У бобовых растений, как уже упоминалось, и мужские и женские гаметы образуются на одном растении, так что в норме происходит самооплодотворение. У людей два типа половых клеток образуются у особей противоположного *пола*, так что всегда происходит перекрестное оплодотворение.

Когда же передается от родителей к детям наш гипотетический генетический материал? Рассмотрим организмы, состоящие всего из одной клетки и размножающиеся бесполом путем, разделяясь на две клетки. При этом процессе родитель, так сказать исчезает, его индивидуальность заменяется двумя дочерними клетками того же самого типа. Образовавшись, дочерние клетки часто сразу расходятся с тем, чтобы никогда больше не встретиться. В этом случае генетический материал должен быть передан до завершения деления клетки. Следовательно, для того, чтобы найти ключи к пониманию физической природы генетического фактора и закономерностей его передачи, необходимо детально изучить клетку и процесс клеточного деления.

МИТОЗ

Мы уже обращали внимание на клеточную преемственность между поколениями. Генетическая передача возможна только благодаря этой преемственности, по крайней мере у одноклеточных организмов, для которых деление клетки эквивалентно воспроизведению. В отношении механизма клеточного деления все организмы, состоящие из клеток, чрезвычайно похожи друг на друга. Поэтому поиски материальной основы генотипа

мы начнем с краткого ознакомления с некоторыми общими свойствами клеточной структуры, а также с тем, как выглядят под микроскопом делящиеся клетки.

Клетка состоит из двух основных частей (рис. 1—3): периферической *цитосомы*, в которой содержатся вещества, образующие *цитоплазму*, и расположенного ближе к центру *ядра*, содержащего *нуклеоплазму*. На последних этапах клеточного деления у высших растений цитоплазма делится за счет образования перегородки, которая возникает внутри и растет к периферии клетки до тех пор, пока не происходит полного разделения на две дочерние клетки. В клетках животных на периферии образуется бороздка, которая углубляется до тех пор, пока родительская клетка не разделяется на две. Степень идентичности дочерних клеток в отношении цитоплазматических компонентов зависит от расположения перегородки или бороздки в родительской клетке. В некоторых случаях деление происходит посередине клетки, но часто оно совершается не в центре, так что две дочерние клетки получают совершенно различное количество цитоплазмы.

Если цитоплазматические компоненты не всегда делятся между дочерними клетками поровну, то с ядерными компонентами этого не происходит. Обычно деление ядра происходит непосредственно перед делением цитосомы. Но ядро не просто делится на две части за счет образования бороздки или перегородки. Вместо этого в ядре перед делением происходит ряд удивительных подготовительных событий. Процесс непрямого деления ядра называется *митозом*.

В то время, когда ядро не проявляет никаких видимых признаков митоза, оно, тем не менее, биохимически очень активно. В это время (рис. 1—4, А) оно окружено *ядерной мембраной* и заполнено рыхлым более или менее однородным материалом, *матриксом*, в котором располагается одно или несколько маленьких тел, называемых *ядрышками*.

Первым указанием на то, что ядро собирается поделиться, служит появление в рыхлом веществе матрикса множества отдельных волокон (рис. 1—4, Б); некоторые из них связаны с ядрышками. Эти волокна называют *хромосомами*. Их появление знаменует собой начало первой стадии митоза — *профазы*. Тщательные цитологические наблюдения выявляют, что каждая хромосома в свою очередь состоит из двух тонких нитей, беспорядочно переплетенных друг с другом. Эти нити, образующие хромосому, называются *хроматидами*. По мере протекания профазы хроматиды во всех хромосомах укорачиваются, утолщаются и постепенно расплетаются (рис. 1—4, В). Ядрышки уменьшаются; предполагается, что часть материала, идущая на утолщение хроматид, поступает из ядрышек. В конце профазы (рис. 1—4, Г) ядрышки и ядерная мембрана исчезают и хроматиды образуют толстые стержни, которые к этому времени впервые начинают активно двигаться. Активное движение не является свойством всей хромосомы, но ограничивается ее определенным участком, называемым *центромерой*, или *кинетохором* (см. стр. 392).

Движение центромер происходит в определенном направлении относительно структуры, называемой *веретеном*, которое формируется в течение профазы. Готовое веретено напоминает кисти рук, касающиеся друг друга кончиками растопыренных пальцев. Запястья соответствуют полюсам веретена, а пальцы — нитям веретена. Где бы ни находились хромосомы относительно аппарата веретена, они движутся так, что их центромеры оказываются в одной плоскости, перпендикулярной оси, соединяющей полюса веретена, то есть в *экваториальной плоскости* веретена, в которой располагаются кончики касающихся пальцев. В это время пассивная часть хромосомы может располагаться относительно веретена произвольным образом. Когда центромеры разместились в экваториальной плоскости веретена, митоз достигает средней фазы — *метафазы* (рис. 1—4, Д).

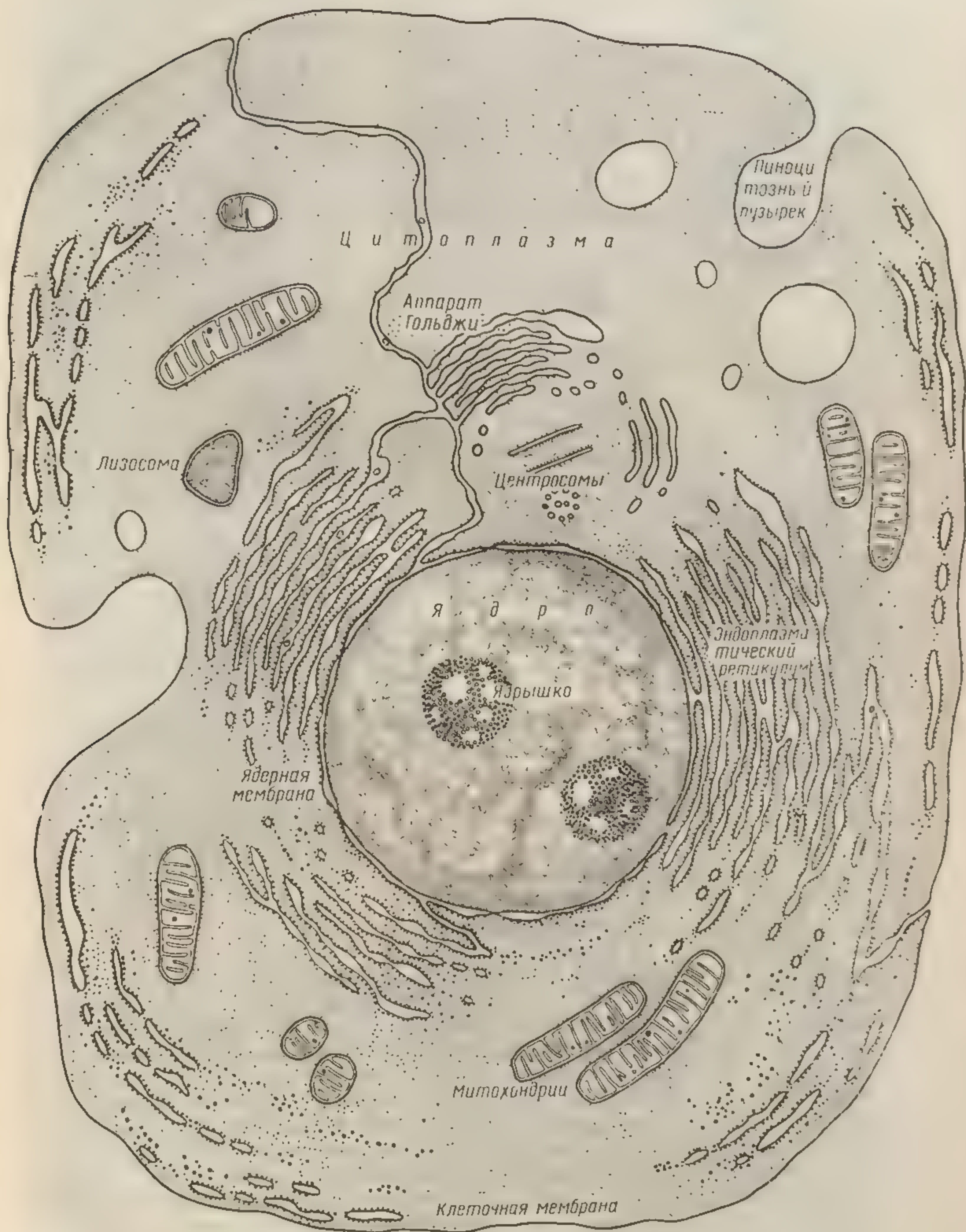


РИС. 1-3.

Схематическое изображение клетки в поперечном разрезе

До сих пор хроматиды хромосом все еще были связаны друг с другом в центромере или рядом с ней, хотя в остальных местах они в основном отделились друг от друга. Теперь хроматиды делятся и в центромерах, и две дочерние центромеры внезапно начинают расходиться в противоположные стороны: одна идет к одному полюсу веретена, вторая — к другому. Центромеры тянут за собой всю хроматиду, которая теперь называется хромосомой. Стадия, на которой хроматиды разделяются, затем двигаются в направлении полюсов и, наконец, собираются в виде хромосом на полюсах, называется *анафазой* (рис. 1—4, E).

Когда хромосомы достигают полюсов, наступает последняя фаза митоза — *телофаза* (рис. 1—4, Ж), в которой события происходят в обратном порядке по сравнению с профазой. Распадается аппарат веретена, вокруг хромосом образуется новая ядерная мембрана, и снова появляются ядрышки. Хромосомы становятся тоньше и длиннее, а затем удается различить, что они состоят из двух тонких переплетенных между собой нитей (хроматид). В конце концов хромосомы уже нельзя различить как обособленные образования, и ядро вступает в *интерфазную, межмитотическую, или метаболическую, стадию* (см. снова рис. 1—4, А).

Может создаться впечатление, что в одном отношении данное нами схематическое описание митоза либо не полно, либо вводит в заблуждение. Действительно, утверждалось, что в профазе хромосома состоит из двух хроматид или нитей, которые в метафазе располагаются определенным образом для того, чтобы затем разделиться в анафазе. Сразу же после разделения новоприобретенная индивидуальность хроматид подчеркивается переименованием их в хромосомы. Но мы определили хромосому как структуру, состоящую из двух видимых нитей! Вопрос, таким образом, заключается в том, содержит ли анафазная хромосома те две нити или хроматиды, которые видны в телофазе? Анафазная хромосома могла бы состоять из двух нитей, если бы каждая хроматида каким-то видимым образом воспроизвела себя в промежутке времени между сильно раскрученным состоянием в профазе и телофазе. Заметим, что вопрос о репликации хроматид обсуждается на том уровне, который может быть обнаружен наблюдениями с помощью микроскопа. Репликацию хромосом и хроматид можно изучать и другими способами. Поэтому рассмотрим некоторые данные о репликации хромосом на химическом уровне, которые помогут нам понять ее удвоение, видимое под микроскопом.

Хромосомы («окрашенные тела») являются единственными клеточными структурами, которые при окрашивании по методу Фельгена приобретают пурпурный цвет. По количеству пурпурной краски в хромосоме можно измерять количество хромосомного материала. Между профазой и телофазой количество *хроматина* (хромосомного материала, окрашиваемого

А. Интерфаза



Д. Метафаза
(вид сбоку)

Рис. 1-4.

Митоз в кончиках корешка в л...

по Фельгену) не изменяется, часов во время интерфазы. хромосома, судя по ее способу поведения. На микроскопическом уровне материал для двух видных хроматид, что он не является другим к другу, что является результатом удвоения хроматид. Репликация хроматид происходит в профазе, когда хромосомы приобретают пурпурный цвет. По количеству пурпурной краски в хромосоме можно измерять количество хромосомного материала. Между профазой и телофазой количество хроматина (хромосомного материала, окрашиваемого

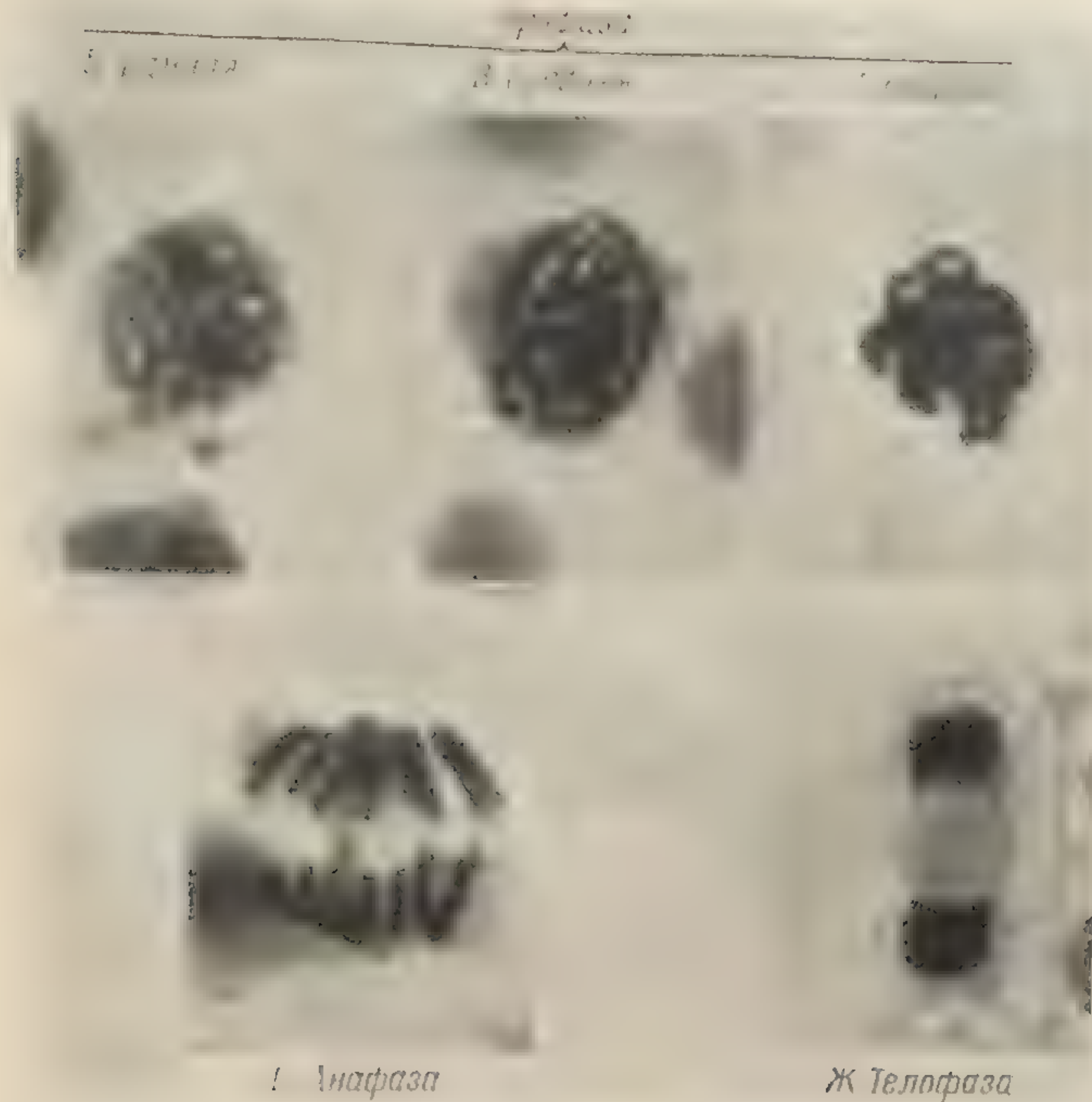


РИС. 1-4.

Митоз в кончиках корешков лука (фото R. E. Cleland)

по Фельгену) не изменяется, но зато оно удваивается в течение нескольких часов во время интерфазы. Таким образом, в начале профазы каждая хромосома, судя по ее способности окрашиваться, химически уже реплицировалась. На микроскопическом уровне это удвоение еще не заметно, так что в каждой из двух видимых хроматид в хромосоме содержится химический материал для двух идентичных хроматид, еще не различимых под микроскопом в виде отдельных нитей. Этот новый материал еще не различим либо потому, что он не принял соответствующей хроматидной формы, либо потому, что, приняв эту форму, две сестринские хроматиды так тесно прилегают друг к другу, что вместе выглядят как одна нить. До того как в телофазе этого же митоза можно будет снова увидеть расплетенные нити, эта репликация на видимом уровне фактически уже подготовлена. Таким образом, химическое удвоение, происходящее в интерфазе, проявляется видимым удвоением хроматид только после наступления ближайшей телофазы.

Каковы же последствия митоза? Если говорить в терминах видимых структур, то хромосомное содержание родительского ядра повторилось в каждом дочернем ядре, так что последующее деление цитоплазмы приводит к образованию дочерних клеток с идентичным хромосомным набором,

точно таким же, как и у родительской клетки, из которой они образовались. Митоз просто является клеточным механизмом, обеспечивающим точное разделение предварительно удвоившегося хромосомного материала. Клетки разных видов отличаются друг от друга либо числом хромосом на одно ядро, либо их морфологией, либо и тем и другим вместе. Разные хромосомы могут отличаться по размерам, по способности окрашиваться разными красителями, по положению центромеры. У большинства хромосом имеется одна не терминальная, расположенная не на конце хромосомы центромера, которая делит хромосому на два плеча. Все хромосомы и хроматиды представляют собой неразветвленные волокна.

При изучении хромосом на стадии метафазы у организмов, размножающихся половым путем, для каждой хромосомы, пришедшей в экваториальную плоскость веретена, обычно находят где-нибудь в другом месте экватора другую хромосому, очень похожую или идентичную первой. Эти идентичные хромосомы располагаются в экваториальной плоскости веретена независимо друг от друга. Таким образом, хромосомы встречаются парами, а участников пары называют *гомологичными хромосомами*, или *гомологами*. Хромосомы из разных пар не гомологичны друг другу, являются *негомологами*. Следует повторить, что гомологи располагаются в экваториальной плоскости веретена независимо друг от друга.

Число хромосом в типичном митозе у садового гороха равно 7 парам, у кукурузы — 10 парам, у домашнего шелковичного червя — 28, у человека — 23 парам. Таким образом, количество хромосом, а также их морфология являются характерными признаками вида. Сколько бы ни было хромосом в зиготе, столько же хромосом обнаруживается в любой клетке многоклеточного организма, образовавшейся из зиготы путем митоза.

ХРОМОСОМА КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Хромосомы являются одним из характерных компонентов, которые передаются всеми клетками дочерним клеткам. Хромосомы воспроизводят себя и в процессе митоза поровну передаются дочерним клеткам, так что последние в этом отношении не отличаются ни друг от друга, ни от родительской клетки. Сделаем дополнительное весьма разумное предположение, что *генетический материал возникает только в результате репликации предсуществующего генетического материала и что разные генотипы возникают друг от друга только в результате мутаций*, т. е. в результате изменения генотипа в альтернативную мутантную форму, которая в свою очередь точно воспроизводит себя до тех пор, пока еще раз не смутится. Иногда в хромосомах могут происходить те или иные видимые изменения. В таких случаях у всех потомков этой измененной хромосомы, образовавшихся в результате митозов, сохраняется исходное изменение. Таким образом, и генетический материал, и хромосомы способны мутировать и затем воспроизводить свою новую форму. На этом основании мы можем высказать предположение, что хромосомы представляют собой или содержат в себе генетический материал.

Мы все время подразумевали, что генетический материал сохраняет свою индивидуальность или целостность независимо от характера внешней среды. Уже упоминалось одно косвенное свидетельство, которое позволяет думать, что это справедливо и в отношении хромосом. Речь идет о том, что в метафазе хромосомы занимают свои места независимо друг от друга. Можно подумать, что когда хромосомы «исчезают» в течение интерфазы, их индивидуальность теряется и даже сами они распадаются. О том, что за время между митозами ядерный материал не диспергируется в цитоплазме, свидетельствуют уже приведенные данные, что полное количество хромосомного материала, выявляемого с помощью окрашивания по Фельгену, сохраняется в ядре в течение интерфазы. Тем не менее возможно, что

компоненты хромосомы, оставаясь в ядре, в интерфазе перемешиваются, а затем восстанавливают свою правильную форму в следующей профазе. В связи с этим можно указать на данные четырех типов. Первые три получены при изучении последовательных митозов. Можно наблюдать за положением хромосом в поздней анафазе или телофазе, а затем следить за их появлением в следующей профазе. При этом обнаруживается такое взаимное расположение хромосом, какое можно ожидать, если они сохранили свою целостность в интерфазе. Во-вторых, так как материал ядрышка не диспергирует во время интерфазы, то, по-видимому, в это время участки хромосом, связанные с ядрышками и называемые ядрышковыми *организаторами*, сохраняют эту связь (Ruddle, 1962). В-третьих, иногда бывает, что две первоначально идентичные гомологичные хромосомы по-разному модифицируются мутациями. Тот факт, что в ряде последовательных митозов такие два гомолога сохраняют эти разные изменения, свидетельствует о том, что каждый гомолог сохраняет свою индивидуальность в течение многих клеточных поколений. И наконец, имеются более прямые данные о сохранении индивидуальности хромосом во время интерфазы, полученные на клетках слюнных желез некоторых мух. Эти гигантские клетки обладают интерфазными ядрами, в которых содержатся гигантские хромосомы. Хотя эти хромосомы довольно сильно раскручены, они явно эквивалентны более закрученным хромосомам, видимым в митозе.

Количество черт сходства между генетическим материалом и хромосомами уже производит большое впечатление. Однако, если все ядра делятся митозом, то гамета должна содержать такое же количество хромосом, что и остальные клетки, образовавшиеся из исходной зиготы. А так как зигота каждого поколения объединяет две гаметы, то количество хромосом в последующих поколениях зигот должно увеличиваться. Поэтому следовало бы ожидать, что количество генетического материала в последующих поколениях при половом размножении должно увеличиваться. На самом деле этого не происходит, поскольку у всех особей данного вида имеется характерный, обычно стабильный хромосомный набор. И действительно, как и следовало ожидать, гаметы человека не содержат двойного, *диплоидного* числа хромосом, т. е. 23 пар негомологичных хромосом. Каждая гамета обычно содержит 23 хромосомы; каждая из них не гомологична всем остальным; эти хромосомы составляют полный непарный *гаплоидный*, или *моноплоидный*, набор хромосом. Таким образом, в зиготе диплоидный хромосомный набор восстанавливается, поскольку каждая гамета дает по одному гаплоидному набору хромосом: один набор содержится в сперматозоиде отца, другой — в яйцеклетке матери. Таким образом, при половом процессе хромосомы из поколения в поколение остаются парными и их число в зиготе не меняется. Отсюда очевидно, что клеточные деления, предшествующие образованию гамет, не могут быть неизменно митотическими и должны на определенном этапе включать особый механизм для уменьшения (редукции) числа хромосом от диплоидного до гаплоидного. Природу этого особого поведения ядра мы рассмотрим в следующей главе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сделано предположение, что организмы обладают генетическим фактором, который отвечает за рождение подобного подобным. Предполагается, что генетический фактор имеет материальную природу и представляет собой генетический материал.

Генетический материал разных видов организмов должен быть различным. Может он отличаться и в разных линиях или породах одного и того же вида. Различие в фенотипе может быть следствием разницы в генетическом материале, или различий во внешних условиях, или в том и в другом.

Можно установить вклад каждого из этих двух факторов в непостоянство фенотипа, если исключить непостоянство другого фактора.

Генотипические различия возникают в результате процесса мутаций. Предполагается, что генетический материал передается от родителей к потомству через клеточный мостик между поколениями. Кроме того, предполагается, что генетический материал самовоспроизводится и возникает только из предсуществующего генетического материала.

Изучение клеточного деления, при котором ядро делится посредством митоза, показало, что из всех клеточных компонентов хромосомы представляют собой структуры, которые наиболее вероятно являются генетическим материалом или его носителем. Эта гипотеза подтверждается рядом свойств хромосом, которые коррелируют с установленными или предполагаемыми свойствами генетического материала. Хромосомы возникают только из предсуществующих хромосом, различные виды обладают различными хромосомными наборами; хромосомный набор количественно и качественно одинаков во всех клетках линии, образовавшейся в результате бесполого размножения; каждая хромосома сохраняет свою индивидуальность в ряду митотических поколений независимо от природы других хромосом. Хромосомы могут изредка мутировать; при этом мутировавшая хромосома воспроизводится в виде мутантной формы.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1.1. Имеет ли какое-либо влияние фенотип предыдущего поколения на генотип последующего? Поясните.

1.2. Как вы относитесь к утверждению, что генотип важнее для организма, чем внешняя среда?

1.3. Могут ли быть внешние условия, при которых живут два организма, совершенно одинаковыми? Поясните.

1.4. Дайте определение генетического фактора? Поясните.

1.5. Можно ли вообще быть уверенным, что именно является определяющим фактором, когда одни и те же черты сходства и различия могут быть вызваны и генотипом, и внешними условиями?

1.6. Какие данные можно привести в пользу того, что генетический материал передается от родителей к потомству? Могут ли эти данные служить окончательным доказательством передачи генетического материала? Поясните.

1.7. Что можно сказать о генетическом материале гималайских кроликов и сиамских кошек?

1.8. Является ли человек удобным объектом для исследования генетического материала? Поясните.

1.9. Каковы по вашему мнению наибольшие и наименьшие размеры генетического материала?

1.10. Является ли существование генетического материала предположением или доказанным фактом? Поясните.

1.11. Какие заключения о свойствах генетического материала можно сделать на основании опытов с бобами?

1.12. Август Вейсман (1834—1914) течение нескольких поколений отрезал у мышей хвосты и обнаружил, что длина хвоста не меняется с каждым новым поколением. В чем значение этих опытов?

1.13. Каковы последствия митоза?

1.14. Для каждого из свойств хромосом, перечисленных в заключении этой главы, укажите соответствующее свойство генетического материала. Какие из этих свойств являются доказанными и какие предполагаемыми?

1.15. Если хромосомы представляют собой генетический материал, то все клетки организма, образовавшиеся в результате митоза, должны



ВИЛЬГЕЛЬМ ЛЮДВИГ
ИОГАННСЕН
(1861—1926).

обладать одинаковым генотипом. Как можно проверить эту мысль, используя многоклеточные растения?

1.16. Можно ли вообразить веретено, которое слишком мало для нормального клеточного деления? Поясните.

1.17. Предположим, что некое ядро в норме делится без помощи веретена. Как это отразилось бы на наших представлениях о генетическом материале?

1.18. Обсудите утверждение, что все клеточные деления в норме происходят в результате митоза.

1.19. В чем разница между удвоением хроматид и удвоением хромосомного материала?

1.20. Перечислите события, которые предположительно происходят перед тем, как данная телофазная хромосома может дать начало хромосоме, полностью построенной из нового хромосомного материала.

1.21. Почему зерна гороха из одного стручка должны быть похожими? Различными?

1.22. Какие выводы относительно природы и целостности хромосомного материала можно сделать на основании перечисленных ниже наблюдений?

а) Негомологичные хромосомы в ряде исследовательских митозов сохраняют характерные для них морфологические различия.

б) Иногда происходит спонтанная потеря одной хромосомы или появление новой, причем все потомки такой клетки, возникшие путем митоза, сохраняют это нарушение.

в) Т. Бовери наблюдал при дроблении яиц у *аскарид*, что когда сестринские клетки вступают в следующий митоз, хромосомы у них часто располагаются таким образом, как будто они являются зеркальным отражением друг друга.

1.23. Какой вывод можно сделать из того факта, что существует три генетически отличающихся линии кукурузы, у одной из которых зерна всегда красные, у другой — всегда желтые, а у третьей зерна желтые, но на солнечном свете краснеют?

ЛИТЕРАТУРА

- J. Brachet a. D. Mazia.* The Living Cell.—Scient. Amer., 1961, 205, N 3.
Chromosome Numbers. In: Handbook of Biological Data, W. S. Spector (Ed.). Philadelphia, 1956, p. 92.
- C. D. Darlington a. E. K. Janaki-Ammal.* Chromosome Atlas of Cultivated Plants. London, 1945.
- W. Flemming.* 1879. Contributions to the knowledge of the cell and its life phenomena.—Сокращенный перевод в Great Experiments in Biology, M. L. Gabriel and S. Fogel (Eds). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1955, p. 240.
- W. Johannsen.* Elemente der exakten Erblchkeitslehre. Jena, 1909. «Heredity in populations and pure lines»,—английский перевод в «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 20 (В. Иогансен. Элементы точного учения об изменчивости и наследственности. Сельхозгиз, 1933).
- S. Makino.* An Atlas of chromosome numbers in animals.—Ames, Iowa, 1951.
- D. Mazia.* Mitosis and physiology of cell division.—In: «The Cell. Meiosis and Mitosis», v. 3, Branchet J. a. Mirsky A. E. (Eds.). N. Y., 1961, p. 77. Русский перевод: Д. Мэзия. Митоз и физиология клеточного деления. ИЛ, 1963.
- F. H. Ruddle.* Nuclear Bleb: A stable interphase marker in established lined of cells in vitro.—J. Nat. Cancer Inst., 1962, 28, 1247.
- F. Schrader.* Mitosis: The movement of chromosomes in cell division. N. Y., 1953.
- C. P. Swanson.* Cytology and Cytogeneitics. Englewood Cliffs, N. Y., Prentice-Hall, 1957.
- C. P. Swanson.* The Cell. 2nd ed. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1964.

МСНОЗ

МЕЙОЗ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ХРОМОСОМ

Какой же процесс приводит к тому, что мужские и женские гаметы содержат только один набор хромосом, в который входит лишь один член из каждой пары гомологичных хромосом, характерных для ядер обычных *соматических* клеток? Если бы гаметы возникали в результате обычного митотического деления, то они были бы диплоидны. Было обнаружено, что уменьшение числа наборов хромосом с двух до одного обеспечивается другим происходящим в ядре процессом, называемым мейозом, при котором происходит два последовательных деления ядра.

МЕЙОЗ

Для того чтобы лучше осмыслить цитологическое описание процесса мейоза, сделаем несколько предположений. Допустим, что процесс, направляющий деление ядра, действует в случае мейоза особенно рано, до того, как хромосомы приобрели определенную степень скрученности или спирализации, характерную для митотической профазы. Предположим далее, что такое состояние относительно слабой спирализации хромосом при данных условиях сочетается с чрезвычайно сильным притяжением одинаковых частей гомологичных хромосом друг к другу, причем силы притяжения действуют на больших, хотя и микроскопических расстояниях. Тогда можно предсказать, как будет происходить мейоз, при котором хромосома без дальнейшей репликации осуществит два последовательных митотических деления (при этом потребуются еще лишь один новый процесс, который мы опишем позднее).

В профазе первого деления мейоза, точно так же, как и в профазе митоза, каждая хромосома состоит из двух хроматид, а также из ровно такого же количества хромосомного материала, еще не различимого в виде хроматид (см. стр. 14). Но в силу рано начавшегося деления ядра каждая хромосома будет спариваться (конъюгировать) со своей гомологичной хромосомой соответствующими друг другу участками, образуя пучок из четырех хроматид, в котором, кроме того, содержится равное количество материала будущих хроматид. Образовав пары, хромосомы парами же движутся в метафазе к экваториальной плоскости веретена. (Вспомним, что в митозе, напротив, каждая хромосома из двух наборов движется к экватору веретена независимо от своей гомологичной хромосомы.) В анафазе участники пары разделяются и движутся к противоположным полюсам веретена, причем каждая анафазная хромосома по-прежнему содержит две хроматиды вместе с равным количеством будущего хроматидного материала. В интерфазе после первой телофазы не происходит синтеза будущего хроматидного материала, поскольку материал, синтезированный во время предыдущей интерфазы, в первом мейотическом делении не был использован на образование видимых хроматид. Теперь в любой момент может начаться второе деление мейоза, которое протекает как обычный митоз. Во второй профазе мейоза каждая хромосома содержит две хроматиды и материал двух будущих хроматид. Каждая хромосома проходит метафазу независимо от других. В анафазе две хроматиды разделяются и расходятся к противоположным полюсам веретена (после деления хроматиды

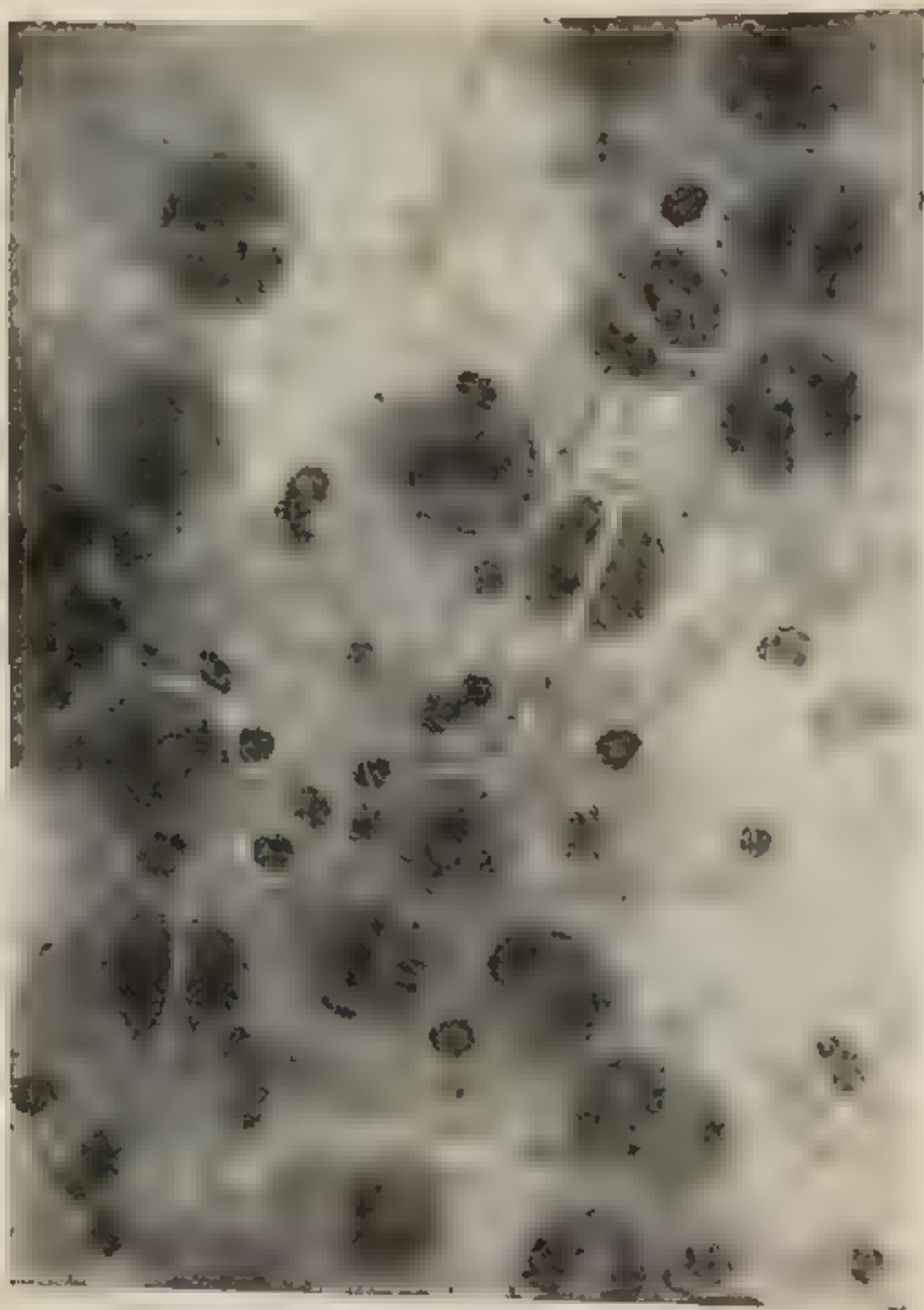


РИС. 2-1.
Мейоз у лилии, общий вид
(фото R. E. Cleland)

можно назвать хромосомами). В телофазе можно различить новые хроматиды, так что каждая телофазная хромосома содержит две хроматиды.

Если в митозе удвоение и деление хромосом чередуются, то в мейозе за одним удвоением следуют два деления. Поэтому в митозе поддерживается диплоидное состояние хромосомного набора, а по завершении мейоза происходит переход из диплоидного в гаплоидное состояние (редукция).

Рассмотрим теперь более детально реальный процесс мейоза, наблюдаемый под микроскопом (рис. 2—1). Профаза первого мейотического деления (*профаза I*) более длительна, чем митотическая профаза и делится на несколько подстадий, каждая из которых обладает своими отличительными свойствами.

1. Появляясь после интерфазного состояния, хромосомы в мейозе длиннее и тоньше хромосом в самой ранней профазе митоза. Это стадия *лептонема* (тонких нитей) профазы I.

2. Затем тонкие нити конъюгируют друг с другом в результате процесса, именуемого *синапсисом*. Подобная конъюгация отличается высокой точностью. Она осуществляется не просто между гомологичными хромосомами, но между точно соответствующими индивидуальными точками гомологов. В работе Н. Jehle (1963) обсуждается физическая природа притяжения между идентичными структурами. Синапс проходит подобно соединению застёжки «молния» до тех пор, пока два гомолога не оказываются полностью связанными. Это стадия *зигонемы* (соединения нитей).

3. Соединение гомологов становится столь тесным, что уже трудно отличить две отдельные хромосомы (стадия *пахинемы*, толстых нитей) (рис. 2—2, А).

4. После этого тесная конъюгация, характерная для пахинемы, ослабляется и тогда можно ясно видеть на стадии *диplotемы* (двойных нитей), что каждая пара хромосом, образующих синапс, содержит четыре нити, по две видимых хроматиды на каждую хромосому (рис. 2—2, Б, В). Пара хромосом, образовавших синапс, называется *бивалентом* (состоящим из двух *моновалентов*), если речь идет о хромосомах, или *тетрадой* (состоящей из двух *диад* или из четырех *монад*), если речь идет о цитологически различимых хроматидах.

Хотя в некоторых местах тетрады хроматиды отходят друг от друга, они по-прежнему тесно контактируют в других местах. Участки, в которых четыре хроматиды по-прежнему тесно связаны друг с другом, называются *хиазмами* (хиазма по гречески — пересечение) (рис. 2—3, А). Хиазма характеризуется тем, что две хроматиды, образующие пару с одной стороны точки контакта, разделяются в ней и с другой стороны точки контакта образуют пары с другими партнерами, т. е. по разные стороны от места контакта две пары конъюгирующих хроматид имеют в своем составе

РИС. 2-2.
Мейоз у лилии, стадия лептонема
(фото R. E. Cleland)

разных партнеров (рис. 2—3, Б). В тетраде обычно бывает по крайней мере одна хиазма. Таким образом наличие хиазмы удерживает моноваленты вместе. Когда в биваленте возникает несколько хиазм, образуются петли, причем соседние петли располагаются под прямым углом друг к другу.

По мере протекания стадии диплонемы хромосомы становятся толще и короче, причем в большей степени, чем в любой из стадий митоза.

5. У некоторых животных, особенно при образовании женских гамет, за диплонемой следует диффузная стадия или стадия роста, в которой

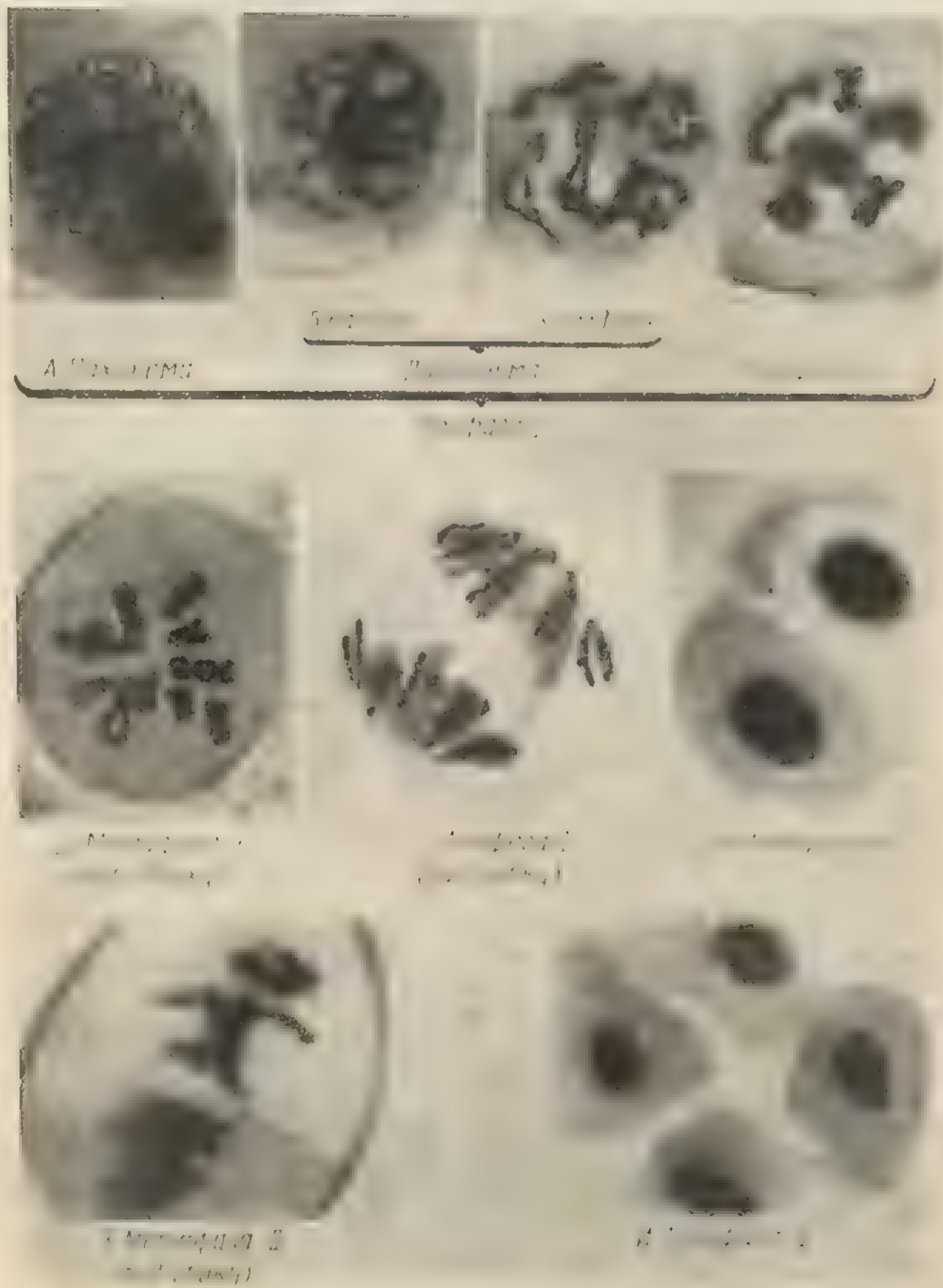


РИС. 2-2.

Мейоз у лилии. Лептонема и зигонема профазы I на рисунке не показаны (фото R. E. Cleland)

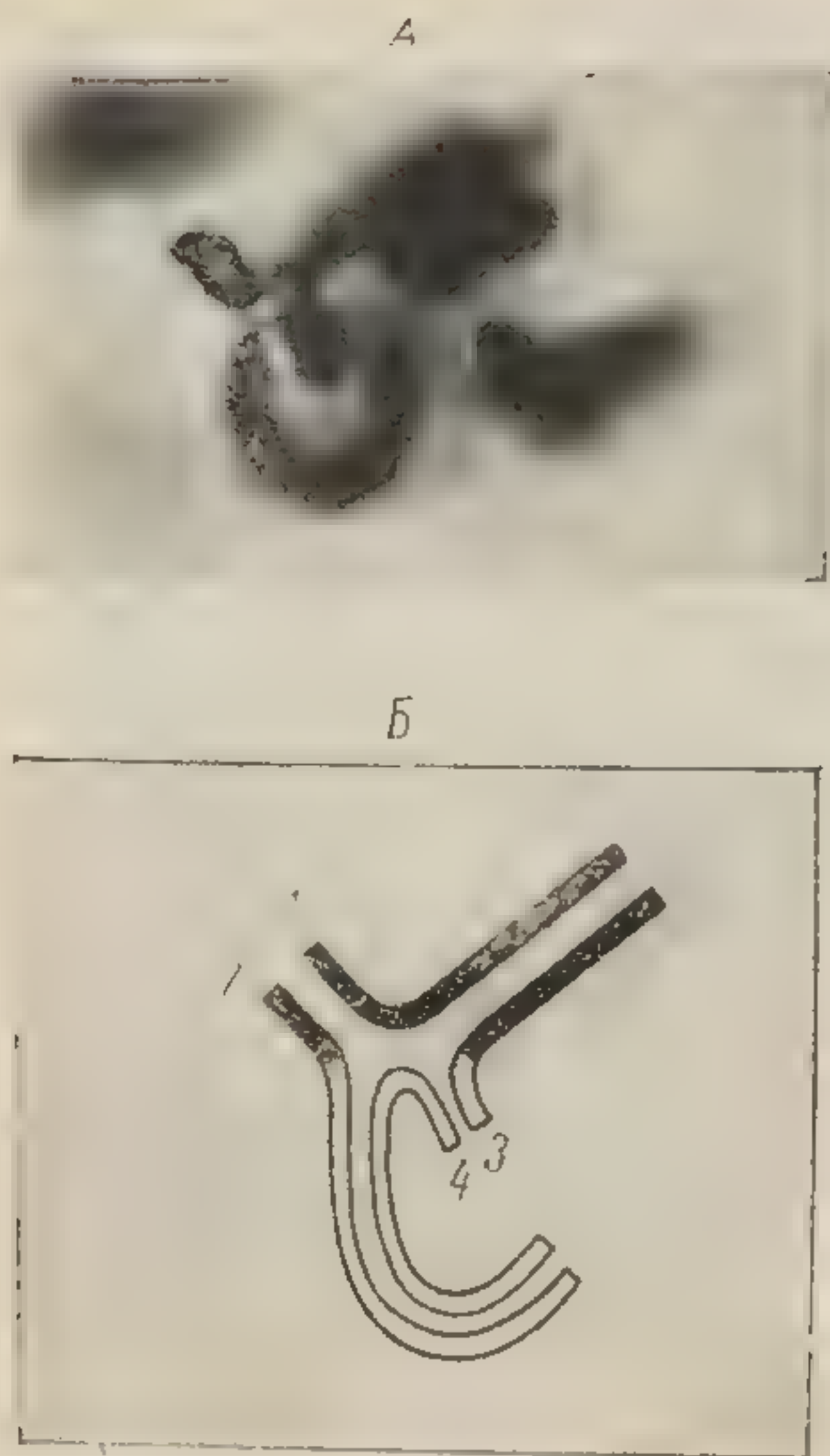


РИС. 2-3.

Диплонема у лилии. Видны хроматиды (1—4), которые по разные стороны от хиазмы конъюгируют с разными партнерами (фото R. E. Cleland)

области центromеры и движутся к противоположным полюсам веретена. Это движение приводит к окончательной терминализации хиазм. На рисунке ясно видно, что в это время каждый моновалент представляет собой диаду. В *телофазе* I образуются два дочерних ядра, а затем следует *интерфаза* I (рис. 2—2, Ж). Длительность интерфазы I у разных организмов неодинакова.

Второе деление мейоза происходит в обоих дочерних ядрах так же, как в митозе. В *профазе* II моноваленты, каждый из которых эквивалентен хромосоме с двумя видимыми хроматидами, сокращаются. В *метафазе* II (рис. 2—2, 3) каждый моновалент независимо от других располагается по экватору веретена. В *анафазе* II участники диады отделяются друг от друга и движутся к противоположным полюсам в виде *монад*, каждая из которых эквивалентна отдельной хромосоме, поскольку все они теперь содержат по две видимых хроматиды. Поскольку это второе деление осуществляют два ядра, то в *телофазе* II образуется четыре ядра (рис. 2—2, И). Фотографии, изображающие процесс мейоза у кукурузы, представлены на рис. 2—4.

РИС. 2-4.

Мейоз у кукурузы

Зигонема не показана. В *анафазе* I (средней) виден бивалент, моноваленты которого еще не разошлись, так как их удерживает хиазма. На стадии *профазы* II и далее видны изменения, которым подвергается одно из двух ядер, образовавшееся после первого деления мейоза (фото. R. E. Cleland)

хромосомы и ядро возвращаются к состоянию, свойственному неделящимся клеткам. На этой стадии происходит значительный рост цитоплазмы. В половых клетках человека диффузная стадия может делиться десятилетиями, после чего проходят оставшиеся стадии мейоза и образуются зрелые яйцеклетки, готовые к овуляции.

6. Стадия *диакинеза* (рис. 2—2, Г) характеризуется максимальным укорочением диплотенных хромосом или максимальным повторным укорочением хромосом из диффузной стадии. По окончании диакинеза исчезают ядрышки и ядерная мембрана и образуется веретено. На этом завершается *профаза* I.

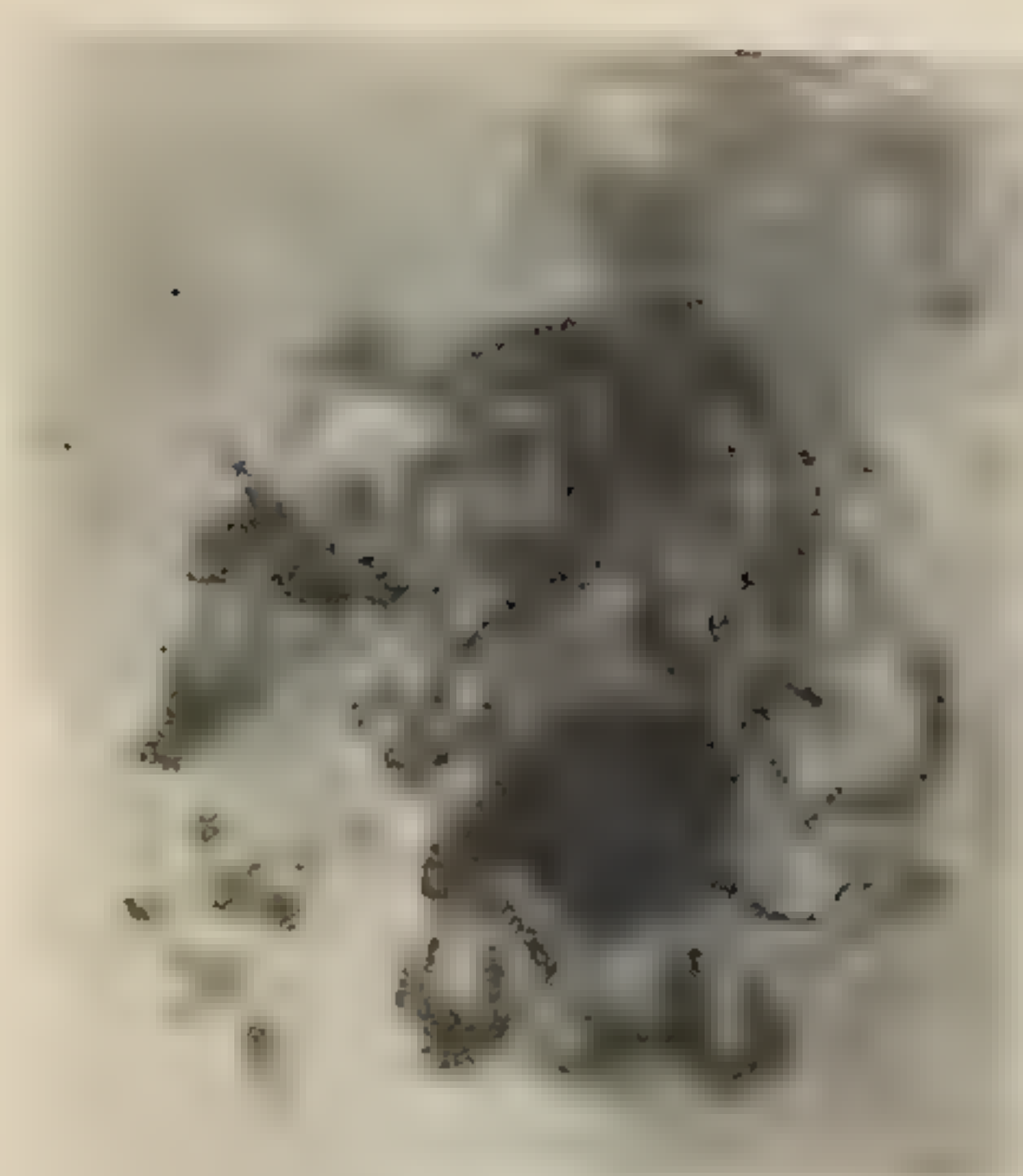
Метафаза I (рис. 2—2, Д) наступает, как и в митозе, при движении хромосом к экватору веретена, только здесь они движутся в виде бивалентов, состоящих из тетрад хроматид, которые по-прежнему удерживаются вместе хиазмами. Между диплонемой и *метафазой* I хиазмы перемещаются к концам плеч хромосом, т. е. удаляются от центromеры, особенно у коротких бивалентов. В результате такой *терминализации хиазм* их число в *метафазе* I может оказаться меньше чем в диплонеме. В *анафазе* I (рис. 2—2, Е) моноваленты каждого бивалента отделяются друг от друга в

ся к со-
ящимся
исходит
ы. В по-
фузная
летиями,
еся ста-
зрелые
япии.
2-2,Г)
ым уко-
осом или
укороче-
й стадии.
исчезают
а и обра-
ершается

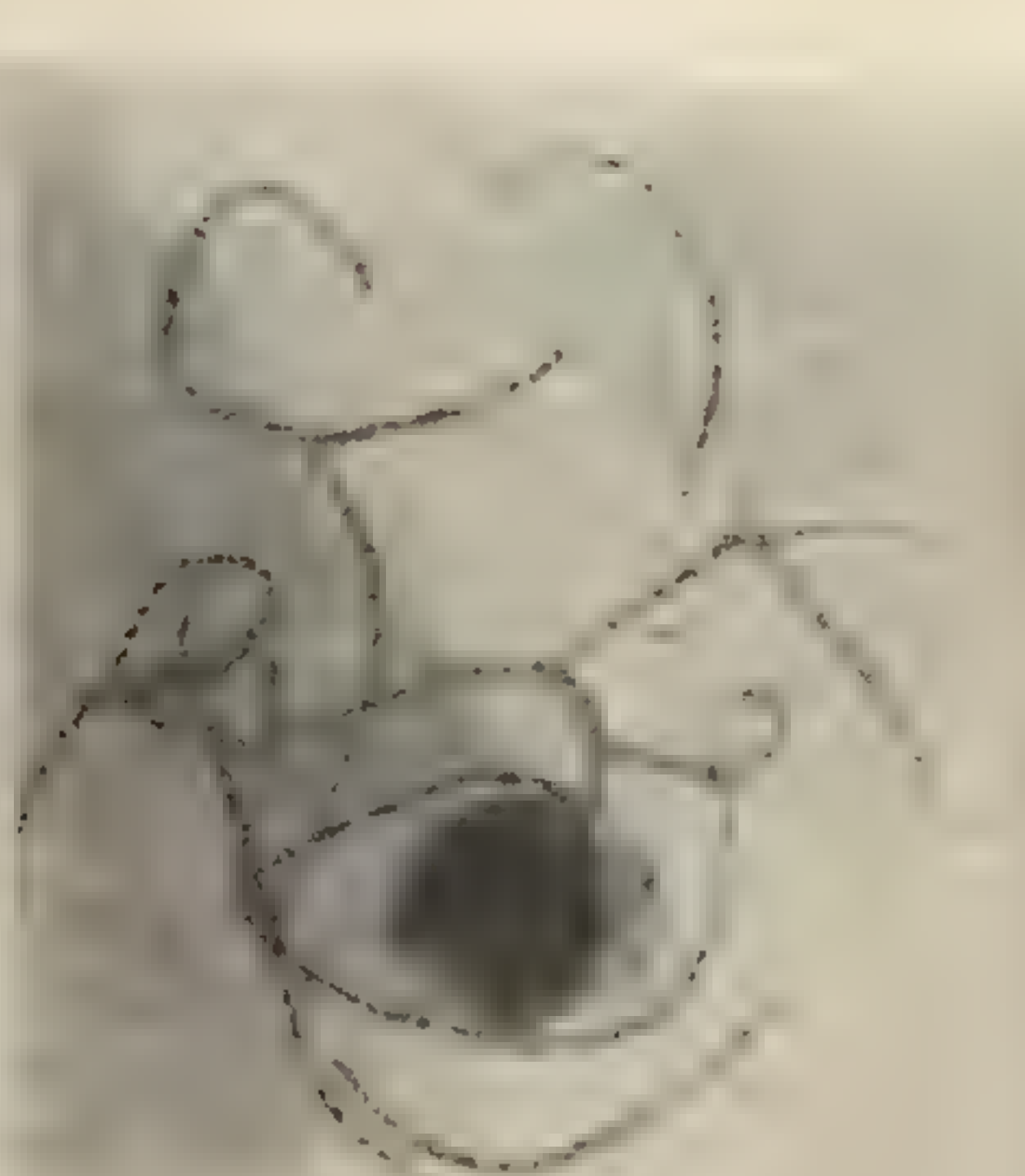
Д) насту-
движении
на, только
бивален-
хроматид,
живаются
иплонемой
емещаются
е. удаля-
нно у ко-
льтате та-
их число
ся меньше
зе I (рис.
дого бива-
т друга в
веретена.
кназм. На
едставляет
затем сле-
разных ор-

ак же, как
вивалентен
етафаза II
полагается
ся друг от
каждая из
они теперь
ление осу-
с. 2-2,И).
едставлены

еще не разом-
я, которым под-
Р. Е. Cleland)



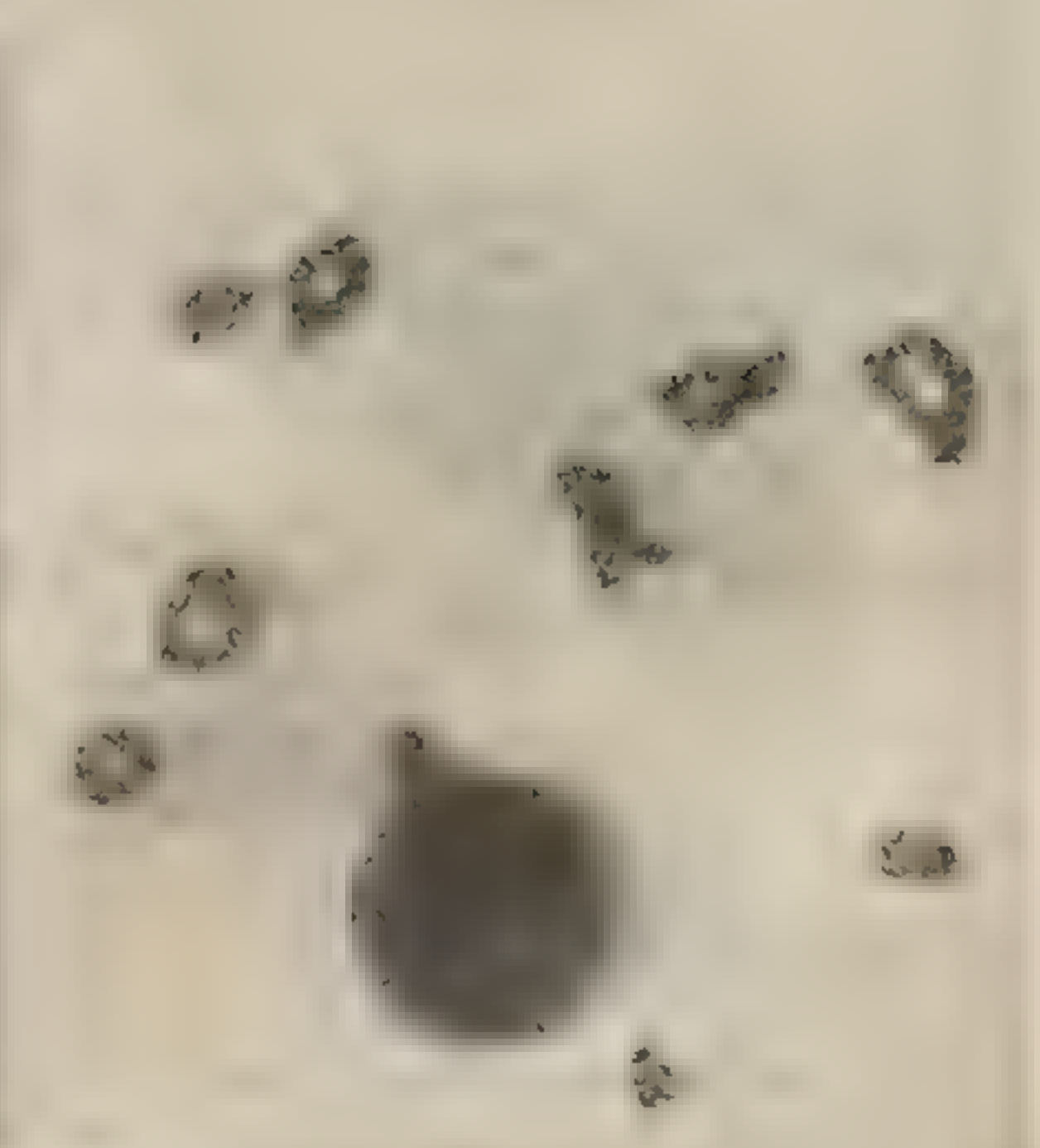
Протина I



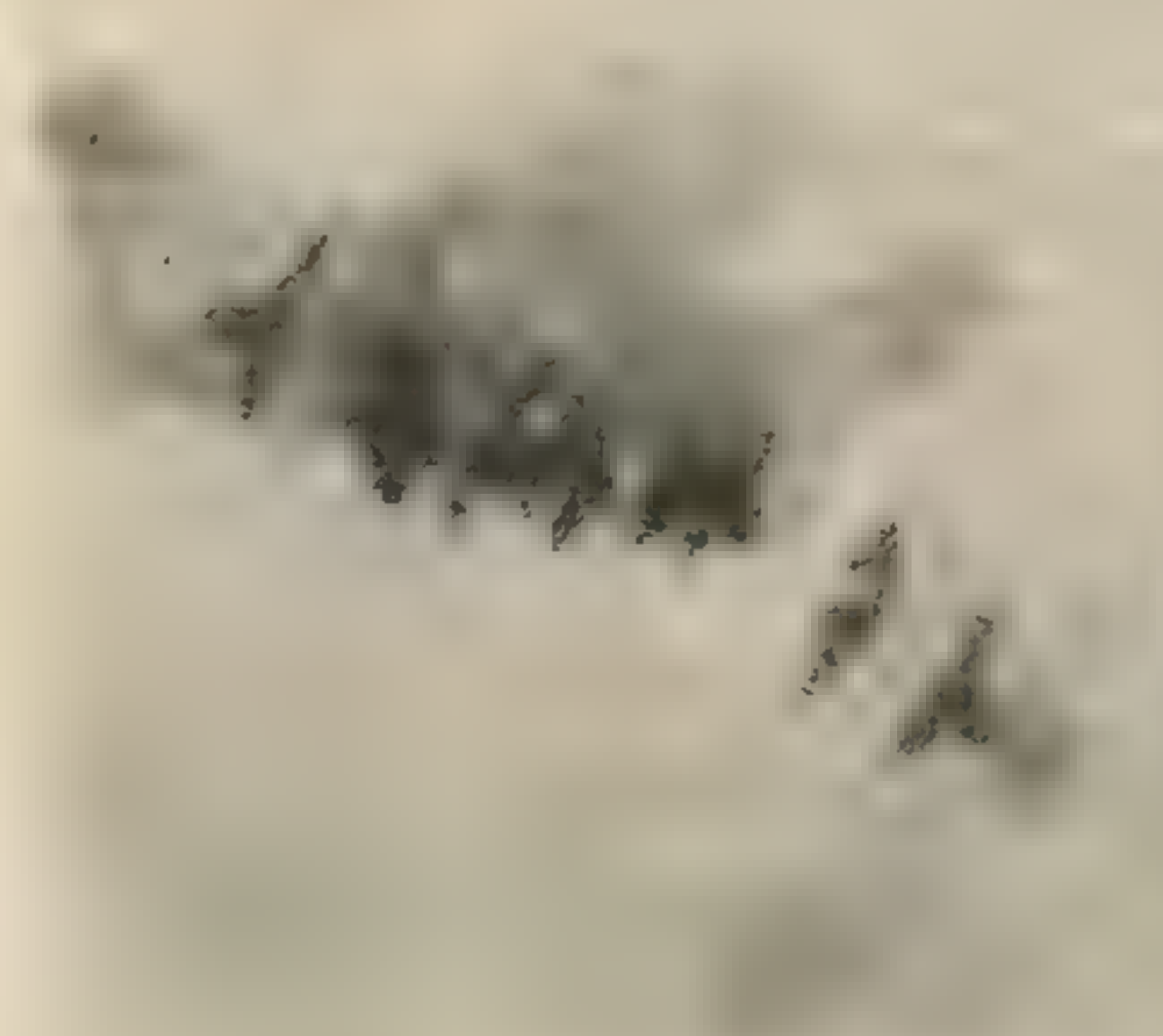
Протина I



Метафаза I



Анафаза I



Метафаза I



Анафаза I (сред)

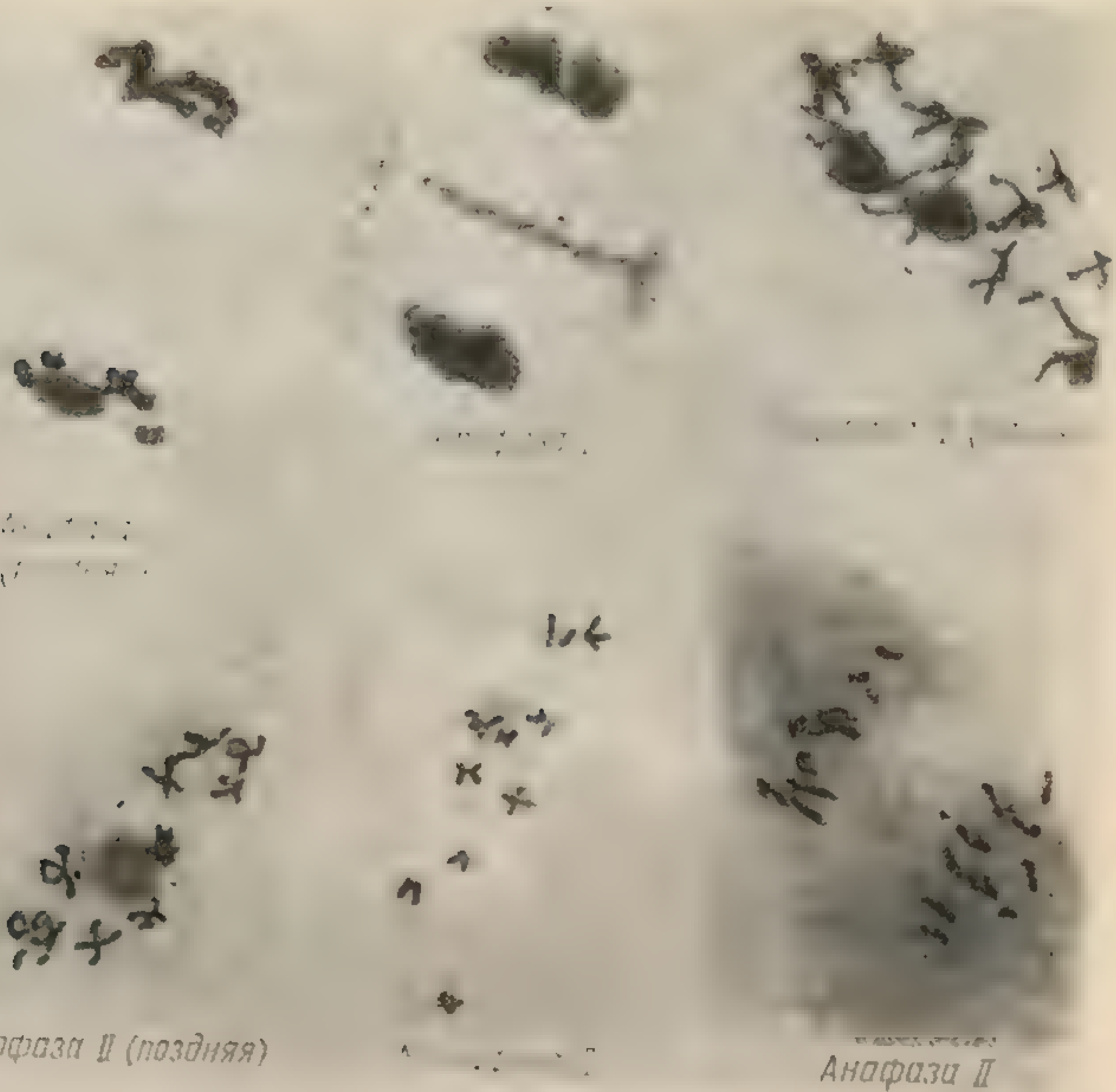


РИС. 2—4 (окончание)

РАСЩЕПЛЕНИЕ ХРОМОСОМ

Рассмотрим теперь последствия мейоза. Организм, в котором происходит мейоз, начал свое существование с зиготы, образовавшейся в результате оплодотворения, при котором происходит объединение двух гаплоидных наборов хромосом: одного материнского и одного отцовского. По завершении мейоза диплоидное парное число хромосом уменьшается (редуцируется) до гаплоидного непарного числа. Каждое ядро после мейоза содержит в норме только по одному из представителей каждой пары хромосом, имевшихся в ядре до начала мейоза — т. е. происходит *расщепление хромосом*. При этом возникает два вопроса. Во-первых, является ли гаплоидный набор хромосом (*генóm*) гаметы точной копией всех хромосом, полученных только от одного родителя (матери или отца)?

Для типичного мейоза ответ на этот вопрос зависит от двух обстоятельств. Во-первых, от того, как располагаются центромеры бивалентов в экваторе веретена в метафазе I. Каждый бивалент располагается в экваторе веретена по отношению к его полюсам независимо от других бивалентов, так что вопрос о том, копия какой хромосомы, отцовской или материнской, пойдет к данному полюсу, является просто делом случая. Рассмотрим для примера распределение двух бивалентов. Поскольку в любой половой железе (*гонаде*) в мейоз вступает много клеток, то примерно в половине из них в анафазе I к одному полюсу пойдут два отцовских, а к другому — два материнских моновалента; примерно в половине клеток к одному полюсу пойдет один отцовский и один материнский моновалент,

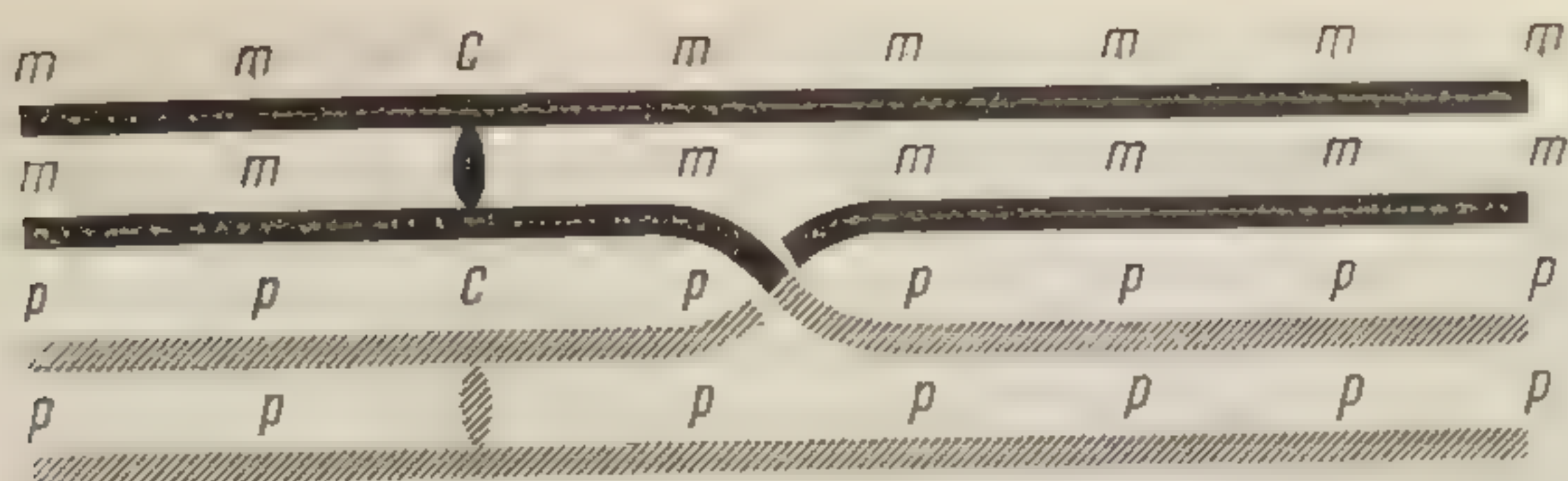


РИС. 2-5.

Схематическое изображение хиазмы, показывающее состав хроматид отцовского (p) и материнского (m) происхождения

а к другому — один материнский и один отцовский моновалент. В результате по завершении мейоза хромосомный состав в фонде всех гаплоидных ядер будет таков: 25% гамет с двумя отцовскими хромосомами, 25% с двумя материнскими хромосомами, 25% с одной отцовской и одной материнской хромосомами и 25% с одной материнской и одной отцовской хромосомами. Центромеры каждого бивалента ориентируются в метафазе I случайным образом; каждый бивалент ориентируется независимо от других, поэтому последующее *расхождение происходит независимо для разных пар хромосом*, что впервые было показано в 1921 г. (E. Carothers). Обратите внимание, что вследствие этого 50% гаплоидных продуктов мейоза обладают той же комбинацией негомологичных хромосом, что и родительские гаметы, образовавшие данный организм. Эти продукты мейоза таким образом сохраняют *старые, или родительские, комбинации*. Напротив, 50% гамет содержат *новые, не родительские комбинации, или рекомбинации*.

Отложим обсуждение генетических последствий этого факта до тех пор, пока мы не рассмотрим другого вопроса, также относящегося к характеру распределения отцовского и материнского материала между гаметами в мейозе. Ответ на этот вопрос может видоизменить только что сделанные заключения. Является ли хромосома в гамете на самом деле копией хромосомы только одного родителя или происходит одновременно от двух родителей? Последняя ситуация могла бы возникнуть в том случае, если бы один сегмент хромосомы в гамете был копией части одного гомолога, а другой сегмент — копией части другого гомолога.

Существует значительное количество данных, свидетельствующих о том, что в какое-то время между началом мейоза и диплономой происходит цитологически необнаружимое событие, в результате которого две из четырех хроматид, образующих тетраду, содержат смешанные сегменты, полученные от обоих родителей, причем эти сегменты строго дополняют друг друга (реципрокны). Так, если в смешанном сегменте одной хроматиды имеется линейная последовательность — материнский участок, а за ним отцовский, то в другой хроматиде сначала идет отцовский участок, а за ним материнский. Другие две хроматиды в этом сегменте являются копиями хроматид только одного из родителей: одна хроматида от отца, а другая — от матери. Акт рекомбинации, приводящий к появлению двух смешанных сегментов, можно назвать *обменом*. Однако не следует считать, что в действительности вслед за разрывом в точно соответствующих точках отцовской и материнской хроматиды происходит перекрестное воссоединение. Весьма вероятно, что на любом уровне синапсис осуществляется сильнее между нитями, происходящими от одного родителя. Соответственно, во время диплономы профазы I, когда хроматиды попарно разделяются, они должны переменить партнера в том месте, где у двух хроматид со смешанным родительским материалом произошел обмен. Такая смена может привести к конфигурации, характерной для хиазмы. Обратите внимание на рис. 2—3, Б, на котором хроматидный материал от одного родителя

закрашен, а от другого — нет; для того, чтобы удержать в синапсисе все соответствующие участки отцовского, а также все соответствующие участки материнского происхождения, хроматидам необходимо поменять партнера. Часть обменов может не привести впоследствии к образованию видимых хиазм; так будет в том случае, если с одной стороны обмена в синапсисе будут участвовать хроматиды, произошедшие от одного родителя, а с другой стороны — от разных. Напротив, каждую хиазму можно рассматривать как цитологическое свидетельство того, что ранее произошел внутритетрадный обмен. Следует, однако, заметить, что из-за терминализации хиазмы могут располагаться ближе к концу бивалента, чем та точка, в которой хроматиды обменивались участками. Впредь мы будем предполагать, что в дипломе не происходит терминализации хиазм, что дает возможность отождествлять место обмена с расположением хиазмы. Соответственно тетрада, содержащая одну хиазму, будет обладать по своей длине отцовским (*p*) и материнским (*m*) составом, изображенным на рис. 2—5, на котором центромера обозначена через *C*. Из этого рисунка видно, что после одной хиазмы одна хроматида остается полностью материнской, другая — полностью отцовской, но две другие состоят из участков как материнского, так и отцовского происхождения. Заметим еще раз, что только две хроматиды из четырех участвуют в единичном обмене. Однако обычно в тетраде содержится несколько хиазм. Это значит, что каждая из четырех хроматид, по-видимому, ранее обменивалась в каком-то месте с хроматидой от другого родителя и, следовательно, имеет по своей длине смешанный состав.

Мы можем теперь вернуться к вопросу о материнско-отцовском составе хромосом в гаплоидных продуктах мейоза. Центромеры бивалентов разделяются в анафазе I. Поэтому расщепление отцовских и материнских центромер происходит в первом делении мейоза. Тогда, в зависимости от положения и числа хиазм в дипломе, монада с материнской центромерой будет по длине своих хроматид содержать различные отцовские сегменты, тогда как монады с отцовской центромерой будут иметь в своем составе дополняющие материнские участки. Итак, расщепление хроматидного материала материнского происхождения и хроматидного материала отцовского происхождения происходит в анафазе I в участках, прилегающих к центромере, и в ряде других участков, и завершается для остальных участков хроматид в анафазе II. Поскольку в метафазе I биваленты выстраиваются независимо друг от друга, мейоз в норме приводит к расщеплению гомологичных участков хромосом и к независимому расщеплению хромосомных сегментов, расположенных в негомологичных хромосомах.

ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМОВ

В организмах, размножающихся половым путем, диплоидное число хромосом поддерживается из поколения в поколение; поэтому не удивительно, что в определенный период жизненного цикла у каждой такой особи происходит мейоз. У большинства животных мейоз происходит во время последних двух делений ядра перед образованием зрелого спермия или яйцеклетки. У разных растений мейоз происходит в разные периоды жизненного цикла, но почти никогда не происходит непосредственно перед формированием гамет. У разных видов существуют небольшие вариации в деталях прохождения мейоза. Рассмотрим жизненные циклы некоторых многоклеточных организмов, которые оказались очень интересными объектами как для цитологических, так и для генетических исследований, т. е. для *цитогенетики*.

1. *Drosophila melanogaster*¹

Взрослая *D. melanogaster*, обычно именуемая плодовой, банановой, или уксусной, мухой, изображена на рис. 2—6. Размеры ее зависят от характера питания и других внешних условий; длина взрослых мух составляет обычно 2—3 мм. При выращивании в сравнимых условиях самки бывают крупнее самцов. У мух дикого типа, т. е. обитающих в природе, серое тело и красные сложные глаза. Самцов легко отличить от самок по наличию половых гребешков на передней паре ножек, по брюшку, которое оканчивается со спинной стороны одной широкой черной полосой (у самок серия полос), а с брюшной стороны — пенисом и вальвами (у самки-яйцекладом).

У взрослого диплоидного самца имеется пара семенников, в которых посредством митозов образуются особые клетки — *сперматогонии*. Когда сперматогоний вступает в мейоз, он называется *первичным сперматоцитом*. Первое деление мейоза приводит к образованию двух *вторичных сперматоцитов*, а второе деление — четырех гаплоидных *сперматид*. Каждая сперматид без последующих делений развивается в *сперматозоид*, или *спермий*. Отметим, что из каждого диплоидного первичного сперматоцита по завершении процесса *сперматогенеза* образуется четыре функционально активных гаплоидных спермия. Так происходит и у самцов многих других высших животных, в частности лягушек, мышей, а также и человека. Спермии хранятся у самца дрозофилы до тех пор, пока они не эякулируются во влагалище самки, откуда они переходят в ее семяприемные органы (пара *сперматек* и *извитой вентральный семяприемник*).

У взрослой самки имеется пара яичников, каждый из которых состоит из нескольких десятков яйцевых трубочек, или *овариол*. На одном из концов яйцевых трубочек находятся *оогонии*. В результате четырех синхронных митотических делений каждый оогоний образует как бы гроздь, состоящую из 16 клеток, одна из которых вступает в мейоз в виде *первичного ооцита*, тогда как остальные служат *питающими клетками* для созревающего ооцита. По мере того как ооцит растет, он перемещается по яйцевой трубочке в яйцевод, а затем в матку. К тому времени, когда яйцо доходит до матки, оно (рис. 2—7) обычно еще не прошло метафазу первого деления мейоза. Сперма, находящаяся в семяприемнике, поступает в матку и опло-

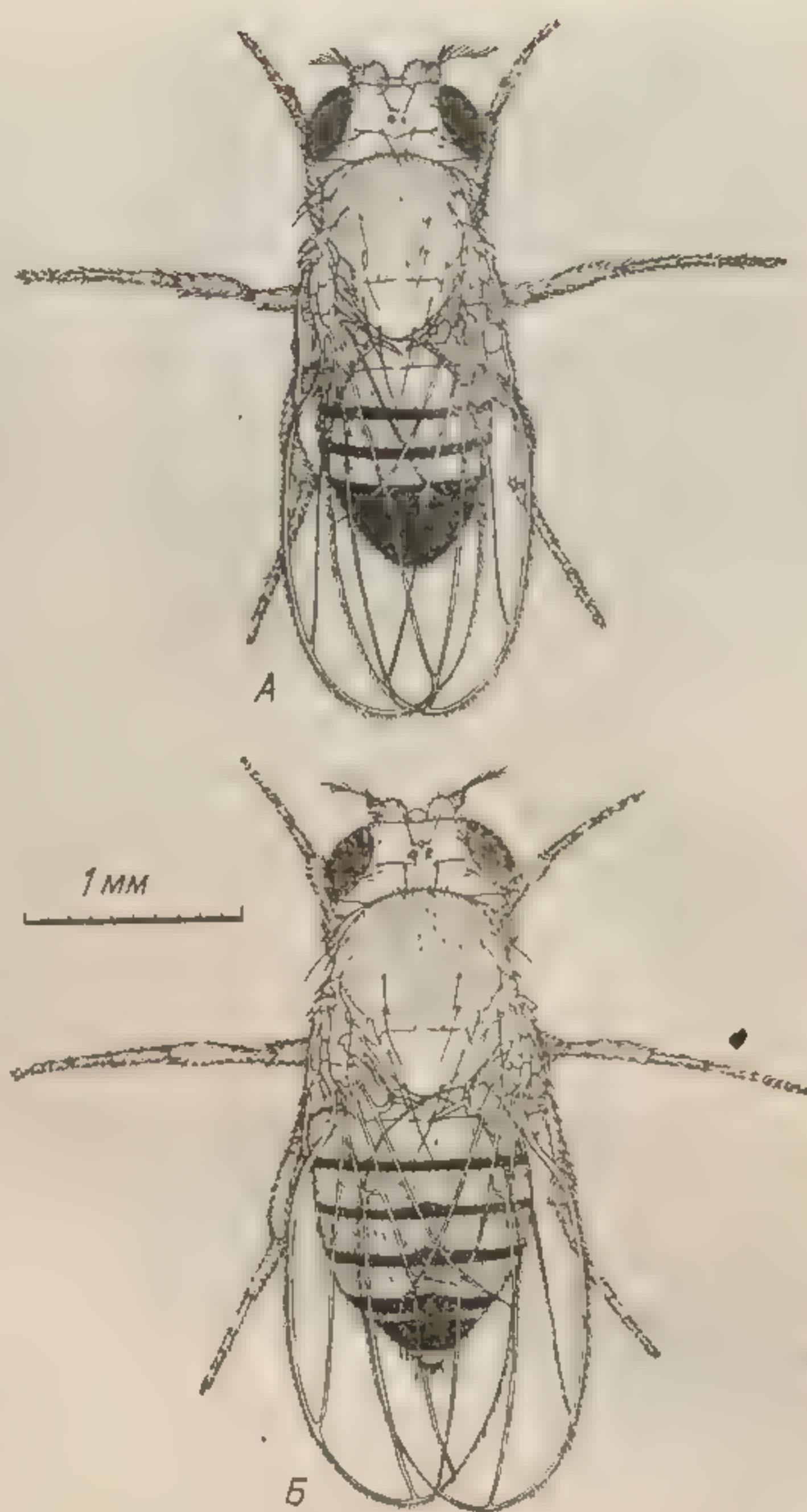


РИС. 2-6.

Самец (А) и самка (Б) нормальной *Drosophila melanogaster* (дикого типа) (рисунок E. W. Wallace)

¹ В Приложении к этой главе приводится литература, относящаяся не только к этому, но и к другим видам дрозофилы.

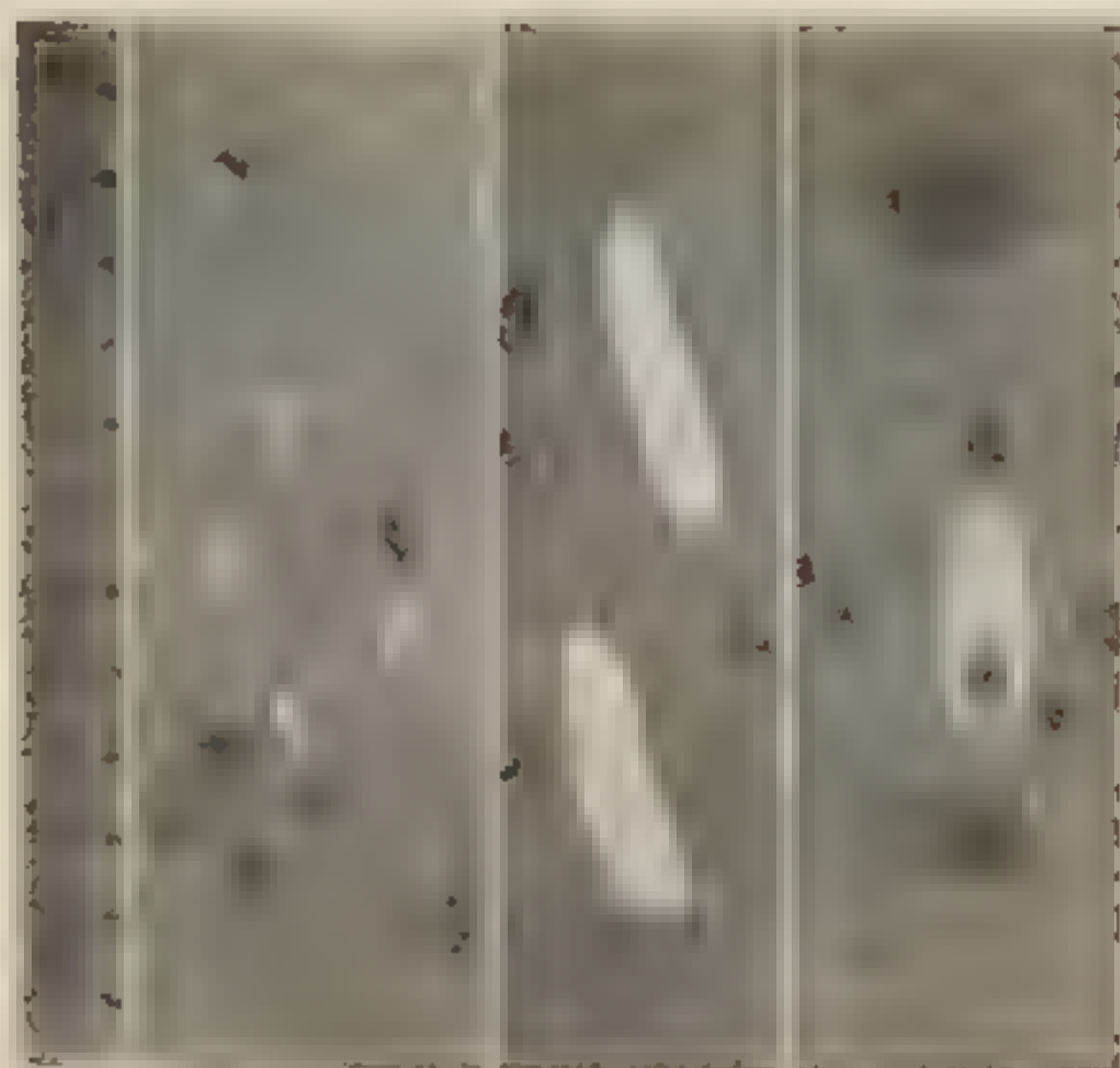


РИС. 2-7.

Яйца, личинки и куколка *Drosophila melanogaster*. Одно деление шкалы соответствует 1 мм (фото Е. R. Balboni)

дотворяет яйцеклетку, после чего первое мейотическое деление продолжается. Два ядра вторичных ооцитов образуют четыре гаплоидных ядра, три из которых, так называемые полярные ядра, дегенерируют, а оставшееся ядро становится гаплоидным ядром яйцеклетки. Отметим, что здесь, как и у самок лягушки, мыши, а также и у женщины, один первичный ооцит образует по завершении оогенеза только одну зрелую гаплоидную яйцеклетку (у человека мейоз также завершается после оплодотворения; яйцеклетка остается на стадии метафазы II до тех пор, пока в нее не внедрится спермий). В теле самки дрозофилы хранятся сотни спермиев и используются они экономно (обычно только один спермий проникает в яйцеклетку), поэтому одно спаривание может привести к появлению сотни потомков.

При температуре 25° С эмбриональное развитие занимает около одного дня, после чего из яйца вылупляется личинка. Еще через четыре дня после двух линек зрелая личинка становится куколкой (рис. 2—7). Примерно через четыре дня после этого, освобождаясь из покровов куколки, вылупляется молодая муха, или имаго. Таким образом за свой жизненный цикл дрозофила претерпевает полный метаморфоз. Хотя обычно спаривание происходит в течение первых суток после вылупления мухи, откладывание яиц начинается обычно на следующий день, так что время одной генерации составляет примерно 10 дней. Взрослые мухи могут жить до 10 недель. За это время самка может отложить несколько тысяч яиц.

2. *Zea mays*¹

Кукуруза, или маис, подобно бобам и садовому гороху, обычно образует и мужские и женские половые органы на одном и том же растении; она, таким образом, *однодомна*. Поскольку диплоидное растение кукурузы образует мужские и женские споры, микроспоры и мегаспоры — соответственно, оно представляет собой *спорофитную стадию* жизненного цикла (рис. 2—8). Микроспоры образуются в метелках на конце стебля. В них материнские диплоидные клетки микроспор, или *микроспороциты*, осуществляют мейоз и образуют каждая по четыре гаплоидных микроспоры (А), каждая из которых развивается в пыльцевое зерно (В).

Поскольку гаплоидные микроспоры образуют гаплоидные гаметы, эти два этапа в жизненном цикле составляют начало и конец мужской *гаметофитной стадии*. Гаплоидное ядро микроспоры делится один раз митотически, образуя два гаплоидных ядра. Одно из этих ядер больше не делится и становится *вегетативным ядром*, или *ядром пыльцевой трубки*. Другое ядро еще раз митотически делится; в результате гаметофит содержит три гаплоидных ядра (В); два последних функционируют как *генеративные ядра* (спермий) (Г, М).

В пазухе верхних листьев у кукурузы развиваются женские соцветия или початки. В пестике каждого цветка содержится по одной диплоидной материнской клетке мегаспоры, или *мегаспороцита*. (Столбики пестиков

¹ В Приложении к этой главе указана литература по кукурузе.

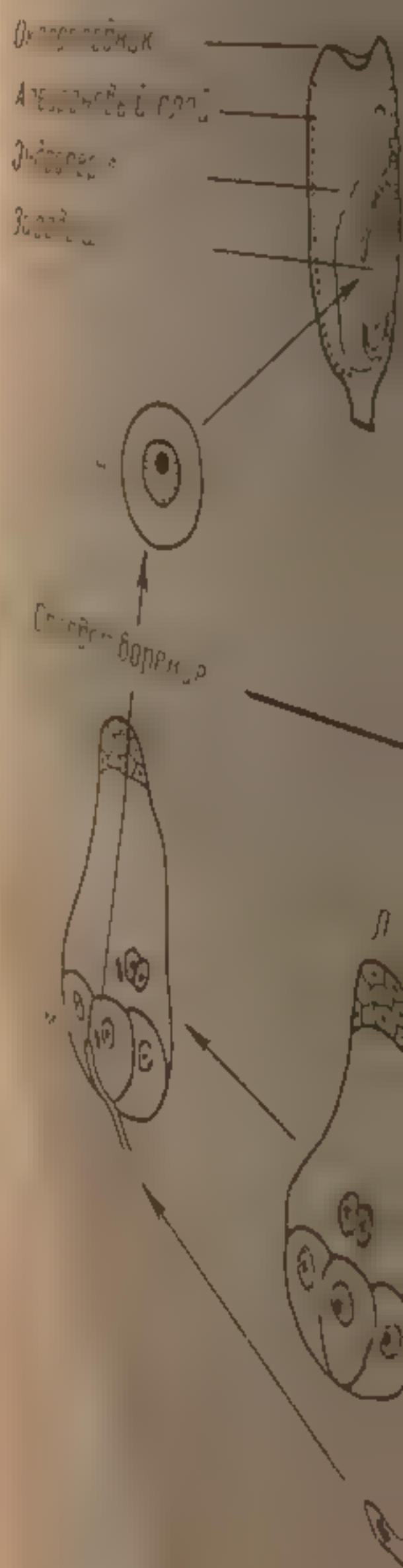


РИС. 2-8.

Жизненный цикл кукурузы
объяснен в тексте
3 и 4 главы

впоследствии превращаются в нити.) Мегаспороцит претерпевает мейоз, в результате чего образуются четыре гаплоидных ядра (D), три из которых дегенерируют (L). Оставшееся ядро мегаспоры делится митотически (H), так же как и его дочерние и внучатые ядра (II), в результате чего получается восемь гаплоидных ядер (K). Три из этих восьми ядер отходят к верхушке зародышевого мешка и становятся ядрами трех клеток антипод; два движутся к центру (полярные ядра), а три (два ядра синергид и одно ядро яйцеклетки) — к основанию зародышевого мешка. Пыльцевая трубка прорастает вниз по столбику пестика до зародышевого мешка, где одно генеративное ядро оплодотворяет ядро яйцеклетки (M , H), так что образуется диплоидное ядро ($2N$), а другое генеративное ядро сливается с двумя полярными ядрами, в результате чего образуется триплоидное ядро ($3N$). После такого двойного оплодотворения начинается стадия спорофита. Митотическое деление диплоидных ядер (H) приводит к образованию зародыша, а триплоидные ядра развиваются в эндосперм. Клетки, лежащие на поверхности эндосперма, составляют алейроновый слой и содержат алейроновые зерна и масла. Остальные клетки эндосперма содержат крахмал. Эндосперм постепенно переваривается, поддерживая питание зародыша и проростка. Наружная поверхность зерна — околоплодник, представляет собой ткань, образовавшуюся из материнского спорофита

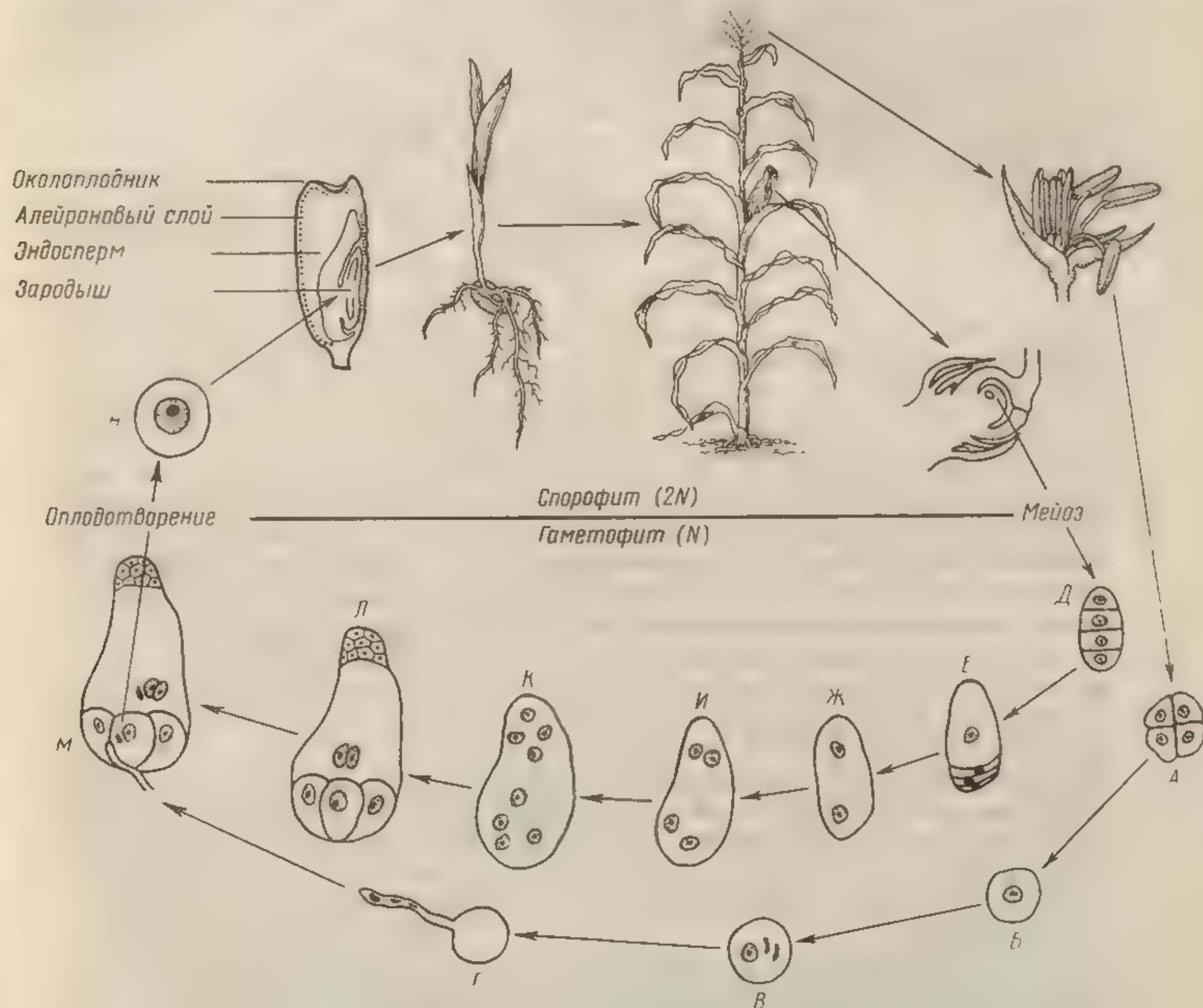


РИС. 2-8.

Жизненный цикл кукурузы, *Zea mays*.
Объяснения в тексте

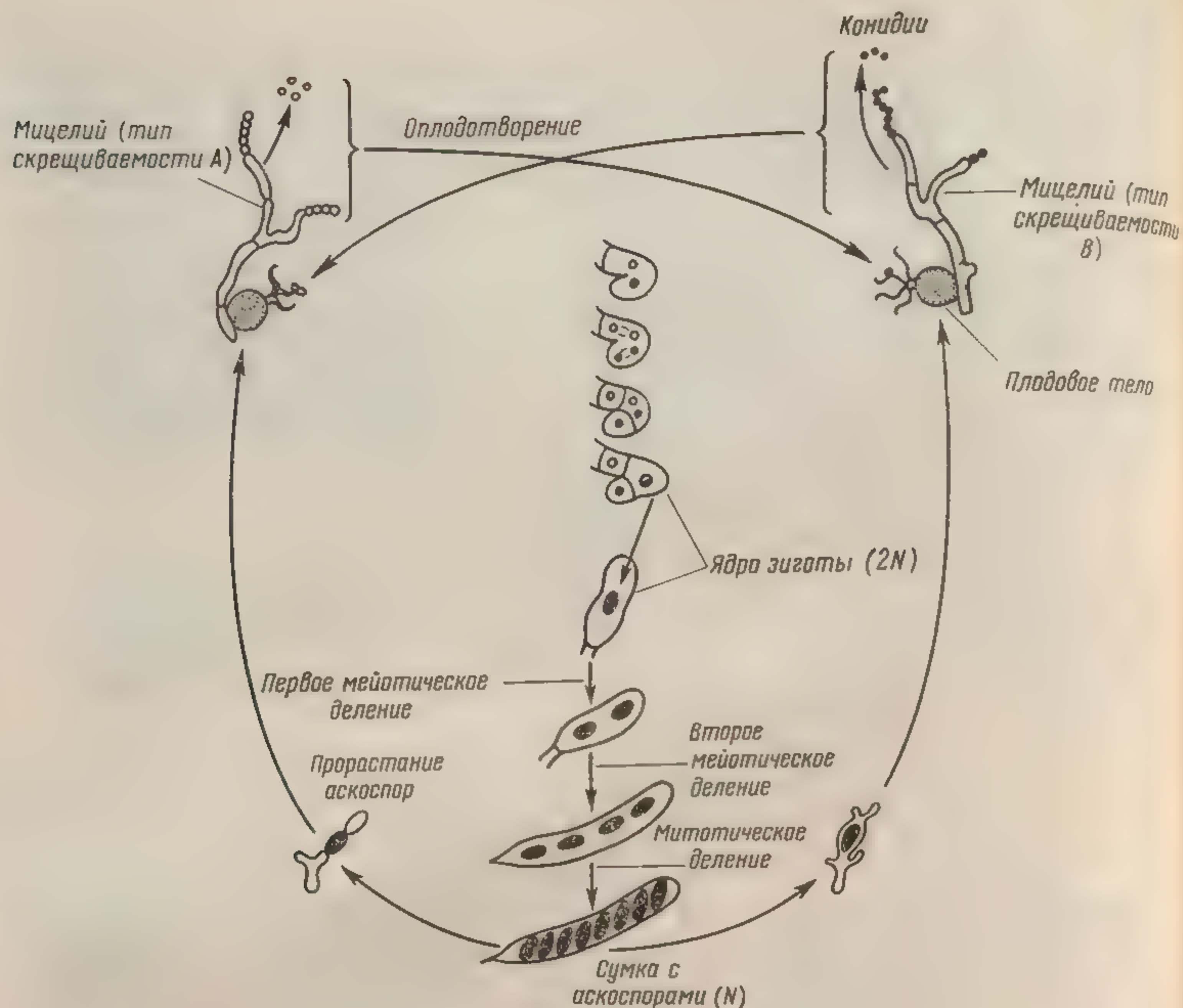


РИС. 2-9.

Жизненный цикл нейроспоры.
Объяснения в тексте

и состоящую из диплоидных клеток. Иными словами, околоплодник образован одним спорофитом, а остальные ткани кукурузного зерна — спорофитом следующего поколения. Для развития зародышевого мешка в зрелое зерно требуется около 8 недель (за это время ядра антипод и синергид и их потомки дегенерируют). Развитие взрослого спорофита из зерна занимает примерно четыре месяца (во время которых первый лист полностью использует эндосперм).

3. *Neurospora crassa*¹

У хлебной плесени нейроспоры гаплоидная вегетативная стадия представлена в виде нитей, или *гифов*, переплетение которых образует пушистую массу, *мицелий*. Гифы ветвятся и сливаются друг с другом. Поскольку клеточные стенки, разделяющие гифы на клетки, — не сплошные, цитоплазма всех нитей непрерывна. Каждая клетка гифов обладает несколькими ядрами.

Культуры этой плесени можно размножать бесполом путем, перенося на новую среду либо фрагменты мицелия, либо споры (*конидии*), содержащие одно или несколько гаплоидных ядер. Для полового размножения

¹ См. Приложение на стр. 37.

необходимо участие д...
сти, образующих плоб...
скрещиваемости прои...
щиваемости, где делит...
ся в результате этого...
с гаплоидными ядрами...
все ядра зигот осуще...
гаплоидных ядра, каж...
что всего образуется в...
плазма и образуется в...
женных в тонкостенно...
содержаться до 300 аск...
ют в воздух. При прора...
и образуют мицелий. И...
противоположного тип...
зую гетерокарион, в ко...

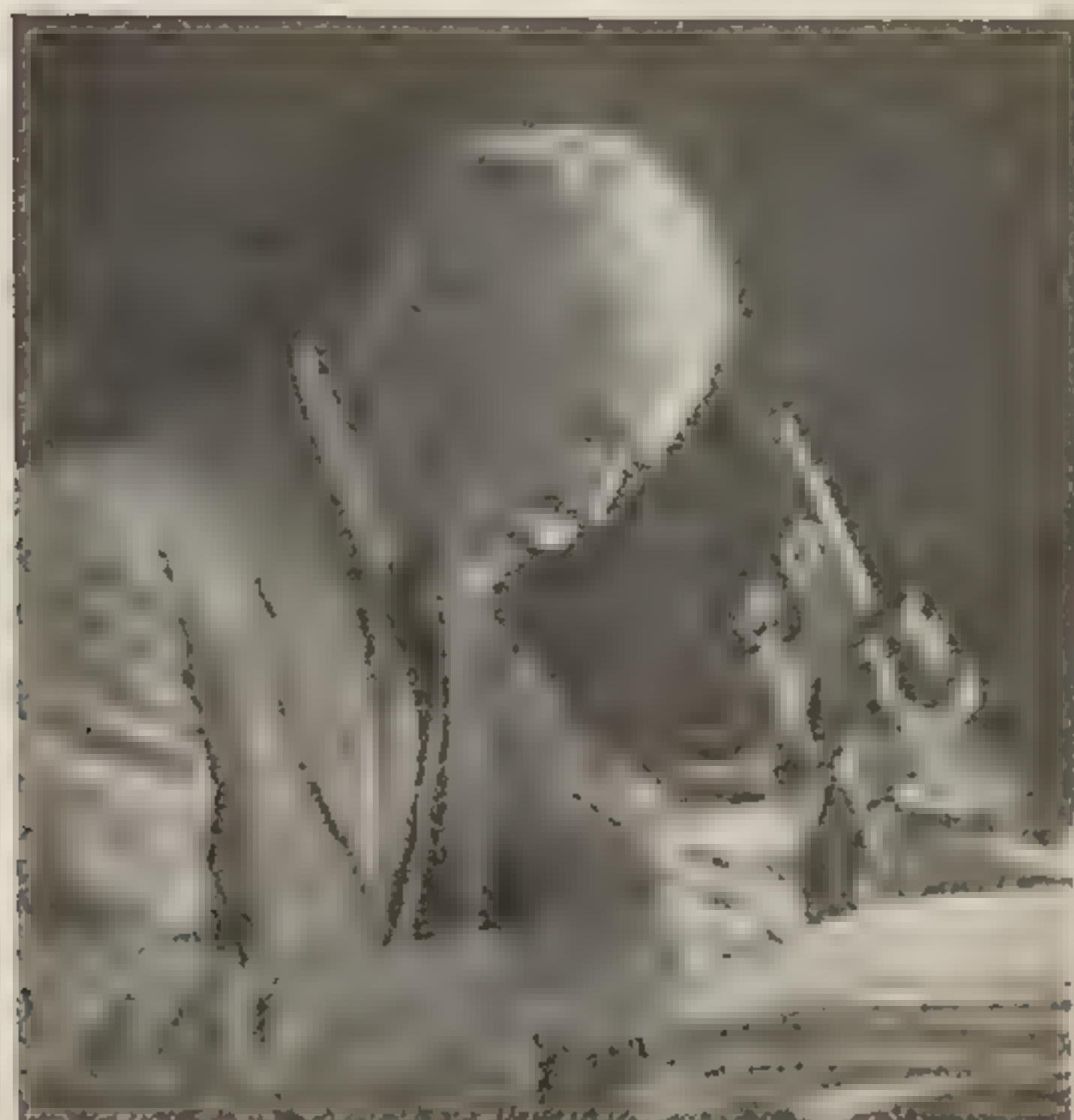
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мейоз состоит по суще...
ванных за счет образова...
удвоения хромосом в ин...
гам.ты может с равной во...
тери, так и от отца (вследс...
но веретена в метафазе I...
лученных от другого род...
в результате мейоза исходна...
присходит не только к...
но и независимое распе...

вопросы для обсуждения

2.1. Могут ли организмы...
ся бесполом путем? Сир...
2.2. В чем сходство и...
2.3. Допустим, что в...
за. К чему бы это при...

ЭДМУНД В. ВИЛСОН
(1856—1939),
американский цитолог



необходимо участие двух плесеней противоположного типа скрещиваемости, образующих *плодовые тела* (рис. 2—9). Гаплоидное ядро одного типа скрещиваемости проникает в плодовое тело противоположного типа скрещиваемости, где делится несколько раз посредством митозов. Получившиеся в результате этого гаплоидные ядра образуют пары, а затем сливаются с гаплоидными ядрами плодового тела, образуя ядра зигот. После этого все ядра зигот осуществляют два мейотических деления, давая четыре гаплоидных ядра, каждое из которых один раз делится митотически, так что всего образуется восемь гаплоидных ядер. После этого делится цитоплазма и образуется восемь яйцевидных гаплоидных *аскоспор*, расположенных в тонкостенном мешке — *аске*. В зрелом плодовом теле может содержаться до 300 асков, из которых аскоспоры освобождаются и попадают в воздух. При прорастании гаплоидные аскоспоры делятся митотически и образуют мицелий. Иногда гифы двух различных штаммов одного или противоположного типа скрещиваемости сливаются друг с другом, образуя *гетерокарион*, в котором клетки гифов содержат ядра обоих штаммов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мейоз состоит по существу из двух митотических делений, модифицированных за счет образования синапсиса и хиазм в профазе I и отсутствия удвоения хромосом в интерфазе I. Каждая конкретная хромосома в геноме гаметы может с равной вероятностью получить копию центромеры как от матери, так и от отца (вследствие случайной ориентации бивалентов относительно веретена в метафазе I) и обычно содержит копии сегментов, исходно полученных от другого родителя (что выявляется по наличию хиазмы). В результате мейоза исходная пара геномов расходится по гаметам. При этом происходит не только расщепление гомологичных сегментов хромосом, но и независимое расщепление сегментов нехомологичных хромосом.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

- 2.1. Могут ли организмы, размножающиеся половым путем, размножаться бесполом путем? Справедливо ли обратное утверждение? Поясните.
- 2.2. В чем сходство и в чем различие между митозом и мейозом?
- 2.3. Допустим, что в ходе эволюции не выработался бы процесс мейоза. К чему бы это привело?

2.4. Некоторые необычные хромосомы представляют собой скорее кольца, чем стержни. Будут ли у кольцевой хромосомы в процессе мейоза возникать какие-либо специфические трудности, не присущие незамкнутой хромосоме? Поясните.

2.5. Сколько имеется бивалентов в метафазе I у человека, кукурузы и садового гороха?

2.6. Обсудите утверждение: во время мейоза каждый участок хромосомы расщепляется независимо от гомологичного участка и независимо от всех остальных хромосомных участков.

2.7. Приведите доводы против гипотезы, согласно которой генетический материал физически реализуется в хромосомах.

2.8. Что происходит при мейозе в организмах с нечетным числом хромосом?

2.9. Допустим, что у животного имеется диплоидный набор хромосом, равный шести. В какой части гамет окажутся копии центромер, исходно полученных от отца? от матери? только от отца? только от матери? и от отца, и от матери?

2.10. Что значат выражения «расщепление при первом делении», «расщепление при втором делении»? При каких условиях данный хромосомный сегмент может осуществить расщепление при первом делении, если обмены, приводящие к хиазмам, могут возникать во многих местах хромосомы? При каких условиях сегмент может осуществить расщепление при втором делении?

2.11. Допустим, что мы увидели одну единственную клетку на стадии метафазы. Как можно определить, что происходило в клетке в момент, когда она была зафиксирована и окрашена: митоз, метафаза I или метафаза II?

2.12. Какими преимуществами обладают для цитологического изучения и для изучения генетического материала такие организмы, как дрозофила, кукуруза и нейроспора?

2.13. В чем основные различия между сперматогенезом и оогенезом у дрозофилы?

2.14. Пусть в паре первоначально идентичных гомологичных хромосом с плечами равной длины произошло стойкое изменение, так что у одной из хромосом образовалось большое утолщение на одном конце, а у другой — небольшое утолщение на противоположном конце. Изобразите, как выглядят эти новые гомологи а) в профазе митоза и б) в дипломе. Как выглядят эти гомологи в телофазе II?

2.15. Всегда ли гаплоидны женские половые клетки человека и дрозофилы? Поясните.

2.16. Чем отличается монада в дипломе от той же монады в телофазе II?

2.17. Какие функции, по вашему мнению, может выполнять полярное ядро при оогенезе у дрозофилы?

2.18. Можно ли ожидать, что митоз в триплоидном эндосперме кукурузы будет протекать нормально? Почему?

ЛИТЕРАТУРА

- E. E. Carothers. Genetical behavior of heteromorphic homologous chromosomes of *Circotettix* (Orthoptera). — J. Morphol. 1921, 35, 457.
C. D. Darlington and A. D. Bradshaw. (Eds). Teaching Genetics in School and University. Edinburgh, 1963.
E. D. P. De Robertis, W. W. Nowinski and F. A. Saez. General Cytology. 3rd ed. Philadelphia, 1960. (Е. де Робертис, Е. Новинский, Ф. Сазес. Общая цитология, ИЛ., 1962).
H. Jehle. Intermolecular forces and biological specificity. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 516—524.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Дрозиды

Библиографический список
до 1962 г. со всеми видами
методическими указаниями,
циклопов, методов культуры,
примеров для студентов,
считываются все статьи,
описанные в 2. Для многих
или ссылки в 1. Готовится
или менее ежегодно, может
быть в разных лабораториях
таблицы и методические замечания

1. «Bibliography on the Genetics of *Drosophila*», ed. by J. H. Muller and J. H. Muller, 1939, 132 p.; 1953, 212 p.; 1963, 344 p. (respectively).
2. C. B. Bridges. The Mutations of *Drosophila*. Carnegie Inst. Wash., 1935.
3. The Biology of *Drosophila*. Edited by University Microfilms.
4. M. Demerec and B. P. Karsten. *Drosophila* Information Service. Eugene, Ore., 1961, 47 p.
5. *Drosophila* Information Service. Eugene, Ore., 1961, 47 p.
6. G. Haskell. Practical Genetics. 124 p.
7. D. L. Lindsley and E. H. Greig. *The Genetics and Biology of *Drosophila**. Philadelphia, 1968.
8. M. W. Strickberger. *Experimental Genetics*. Englewood Cliffs, N. J., 1968.
9. A. Kesselbach. The structure of the chromosome. Exper. Station. Agric. News Letter, M. M. Id. 1963.
10. G. F. Sprague. Corn and Corn Inbreeding. A catalogue of genetic material. 1952, 14, 183.
11. B. L. ... and W. N. Strickberger.
12. J. H. Muller and P. B. Day.
13. F. J. ... and P. B. Day.
14. E. P. ... and K. M. ...

- K. R. Lewis a. B. John. Chromosome Marker. London, 1963.
- J. McLeisch a. B. Shoad. Looking at Chromosomes. N. Y., 1958.
- M. M. Rhoades. Meiosis. In: «The Cell», v. 3. Meiosis and Mitosis, Brachet J. a. Mirsky A. E. (Eds). N. Y., 1961, p. 1—75.
- W. S. Sutton. The chromosomes in heredity.— Biol. Bull., 1903, 4, 231—251. Перепечатано в «Great experiments in Biology», Gabriel M. L. a. Fogel S. (Eds). N. Y., Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1955, p. 248—254; а также в «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 27.
- C. P. Swanson. Cytology and Cytogenetics. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1957.
- E. Van Beneden. 1883. Researches on the maturation of the egg and fertilization.— Перевод в «Great experiments in biology», M. L. Gabriel a. S. Fogel (Eds). Englewood Cliffs. Prentice-Hall, 1955, p. 245.
- E. B. Wilson. The Cell in Development and Heredity. 3rd ed. N. Y., 1937.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Дрозофила

Библиографические сведения относительно большинства, если не всех работ вплоть до 1962 г. со всеми видами дрозофилы, можно найти в источнике 1, где имеются предметные указатели, позднейшие работы — в источнике 5. Описания жизненных циклов, методов культивирования, а также генетических и цитологических экспериментов для студенческого практикума имеются в 3, 4, 6, 8. В 3 детально рассматриваются все стороны биологии дрозофилы. Мутанты, обнаруженные до 1942 г., описаны в 2. Для многих мутантов, обнаруженных позднее, имеются описания в 5 или ссылки в 1. Готовится новая полная сводка 7. В бюллетене 5, выходящем более или менее ежегодно, можно найти списки различных видов дрозофилы, поддерживаемых в разных лабораториях, адреса ученых, работающих с дрозофилой, экспериментальные и методические заметки.

1. «Bibliography on the Genetics of *Drosophila*». Part I. H. J. Muller (Edinburgh; Oliver and Boyd, 1939, 132p. Parts. II, III and IV by I. H. Herskowitz, Oxford: Alden Press, 1953, 212 p.; Bloomington Indiana Univ. Press, 1958, 296 p. N. Y., McGraw Hill 1963, 344, p. (respectively).
2. C. B. Bridges. The Mutants of *Drosophila melanogaster*, K. S. Brehme (Ed.). Washington, Carnegie Inst. Washington, Publ. 552, 1944, 257p.
3. The Biology of *Drosophila*. M. Demerec (Ed.). N. Y., J. Wiley a. Sons, Xerographed by University Microfilms, 313 N. 1st Street, Ann Arbor, Michigan, 1950, 632 p.
4. M. Demerec and B. P. Kaufmann. *Drosophila* Guide, 7th ed. Washington, Carnegie Inst., 1961, 47 p.
5. *Drosophila* Information Service. E. Novitski (Ed.). Dept. Biology, Univ. Oregon, Eugene, Ore.
6. G. Haskell. Practical Heredity with *Drosophila*. Edinburgh and London, 1961, 124 p.
7. D. L. Lindsley a. E. H. Grell. The Mutants of *Drosophila*. Washington, 1965.
8. M. W. Strickberger. Experiments in Genetics with *Drosophila*. N. Y., 1962, 144 p.

Кукуруза

- T. A. Kiesselbach. The structure and reproduction of corn.— Univ. Nebraska Coll. Agric., Agric. Exper. Station. Res. Bull., 1949, 161.
- Maize News Letter, M. M. Rhoades (Ed.). Bloomington.
- G. F. Sprague. Corn and Corn Improvement. N. Y., 1955.
- J. Weiher. A catalogue of genetic maize types together with a maize bibliography.— Bibliogr. genet., 1952, 14, 189.

Нейроспора

- B. Bachmann and W. N. Strickland. *Neurospora* Bibliography and Index. New Haven, 1965.
- J. R. S. Fincham and P. R. Day. Fungal Genetics. Oxford, 1963.
- F. J. Ryan. Selected methods of *Neurospora* genetics.— Methods in Med. Res., 1950, 3, 51.
- R. P. Wagner and H. K. Mitchell. Genetics and metabolism. 2nd ed. N. Y., 1964.

Глава 3

РАСЩЕПЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ

Сходство и различие в фенотипах родителей и их потомства привело нас к необходимости постулировать существование генетического материала. Поскольку предполагается, что этот материал передается из поколения в поколения, мы можем получить определенные сведения о характере передачи генетического материала, следуя признакам, которые повторяются в ряду поколений. Эту область исследований можно назвать «генетикой передачи», или «трансмиссионной генетикой».

Можно изучать генетический материал как в линиях, размножающихся бесполом путем, так и в линиях, которые подобно рассмотренным ранее бобам, размножаются половым путем в результате самооплодотворения. Однако вместо того, чтобы заниматься такими исследованиями, при которых мы всегда будем иметь дело с чистыми линиями, изучим трансмиссионную генетику организмов, размножающихся половым путем в результате перекрестного оплодотворения. Впредь во всех описываемых экспериментальных работах подразумевается, *если только не оговорено обратное*, что были приняты необходимые предосторожности, обеспечивающие уверенность в том, что *описываемое фенотипическое сходство или различие имеет генетическую природу*, а не обусловлено изменением внешних условий.

В разных линиях перекрестно оплодотворяющихся животных и растений часто наблюдаются фенотипические различия по определенным признакам. Например, если речь идет о высоте, то особи одной линии могут быть низкими, а другой — высокими; если речь идет об окраске, то в одной линии она может быть красной, а в другой — белой. Здесь уместно поставить вопрос: каков будет фенотип потомства, если скрестить две линии, отличающиеся по одному признаку? Могут ли результаты такого скрещивания дать какие-либо сведения о генетическом материале?

Рассмотрим несколько конкретных экспериментов с садовым горохом, проведенных Менделем. Обсудим сначала, какие опыты можно ставить на этом объекте и зачем их нужно ставить, а затем изучим полученные результаты и посмотрим, что они дают для понимания природы генетического материала.

Садовый горох может служить удобным объектом для опытов по гибридизации, потому что выращивать его просто и недорого, а период между двумя поколениями достаточно мал, что позволяет изучать подряд несколько поколений. Хотя в норме садовый горох самоопыляется, у него осуществимо и перекрестное опыление, так что экспериментатор с помощью простых методов может контролировать все акты опыления. Далее, имеется большое число линий, которые фенотипически отличаются друг от друга по ряду признаков. Необходимо, конечно, разводить эти линии в течение нескольких поколений путем самоопыления и при этом следить за фенотипом, чтобы быть уверенным в том, что мы имеем дело действительно с чистыми линиями.

Какие же чистые линии следует скрестить между собой? Поскольку неизвестно, какой фенотип следует ожидать в потомстве, то не следует пользоваться линиями, у которых признаки столь подвержены влиянию внешних условий, что фенотип одной линии встречается и в другой, как, например, было в линиях бобов, о которых шла речь в первой главе. Такое

перекрывание ф
установить, с к
отобрать только
ными различия
линии, которые
того, нужно по
ное опыление ус
давать в одних
реципрокные скр
узнать, играет ли
витие потомство
тении).

Все скрещива
т. е. родительски
энергично растут
опылении, но и п
предосторожност
или, что более ва
кой из начавших
оплодотворения
не случайным обр
жет привести к т
недооценим их ча
Это особенно опас
ческий материал п
свое развитие, т. е.
в таких опытах нео
типов родителей и

Две линии садо
ми цветками, — уд
В качестве родите
линии с окрашенны
ками. Было проведен
шиеся в результате
растений была пров
первое дочернее поко
ний, как и у одного
ных скрещиваниях по
щих главах (если не с
щивания проводились

Что можно сказа
татов? Введем для кр
рвала. Генетический м
щий во всех растениях
начим С, генетический
во всех растениях чист
тения F₁ должны соде
произошло с с? Может

Можно получить д
вия F₁ с окрашенным
ления), размножить
Если от каждого расте
F₂, то оказывается, что
ки окрашены, а у части
начениями генетическо
С, либо (соответственн
F₂ содержат С, но

перекрывание фенотипов не позволит на основании данных о фенотипе установить, с каким генотипом мы имеем дело. Следовательно, нужно отобрать только линии с резкими, неперекрывающимися, хорошо заметными различиями. Во избежание излишних сложностей следует брать линии, которые отличаются лишь по одному основному признаку. Кроме того, нужно пользоваться только такими линиями, у которых перекрестное опыление успешно идет в обоих направлениях, т. е. обе линии должны давать в одних случаях мужские гаметы, а в других — женские. Такие *реципрокные скрещивания* весьма желательно проводить для того, чтобы узнать, играет ли какую-либо роль то, на какой линии начинается свое развитие потомство (так как зерна гороха образуются на материнском растении).

Все скрещивания, естественно, должны быть полностью плодovиты, т. е. родительские линии должны состоять из стойких растений, которые энергично растут и дают много семян, созревающих не только при самоопылении, но и при реципрокных скрещиваниях. Если не соблюдать эту предосторожность, то может получиться недостаточное число потомков или, что более важно, наблюдаемое потомство окажется неполной выборкой из начавших свое развитие зерен. Гибель потомства между моментом оплодотворения и моментом изучения его фенотипа может происходить не случайным образом. Разная жизнеспособность разных генотипов может привести к тому, что мы не заметим определенных фенотипов или недооценим их частоту, что вызовет ошибочное определение генотипов. Это особенно опасно, если учесть, что, по нашим представлениям, генетический материал передается в тот момент, когда новый организм начинает свое развитие, т. е. в момент оплодотворения. Само собой разумеется, что в таких опытах необходимо вести тщательную запись родословных и фенотипов родителей и потомков.

Две линии садового гороха — одна с окрашенными, а другая с белыми цветками, — удовлетворяют всем перечисленным выше требованиям. В качестве *родителей первого поколения* (P_1) были взяты растения из одной линии с окрашенными цветками и из другой чистой линии с белыми цветками. Было проведено реципрокное перекрестное опыление, образовавшиеся в результате этого семена-потомки были посеяны и у выросших растений была проверена окраска цветков. Все потомство, составляющее *первое дочернее поколение* (F_1), было фенотипически однородно: у всех растений, как и у одного из родителей P_1 , цветки были окрашены. В реципрокных скрещиваниях получились одинаковые результаты. В этой и последующих главах (если не оговорено обратное), *всюду подразумевается, что скрещивания проводились реципрокно и дали одинаковый результат.*

Что можно сказать о генетическом материале на основании этих результатов? Введем для краткости некоторые обозначения генетического материала. Генетический материал, дающий окрашенные цветки и присутствующий во всех растениях чистой линии, имеющей окрашенные цветки, обозначим C , генетический материал, дающий белые цветки и присутствующий во всех растениях чистой линии с белыми цветками, обозначим c . Все растения F_1 должны содержать C , так как цветки у них окрашены. Что же произошло с c ? Может быть, он не был передан?

Можно получить дополнительные сведения, если использовать растения F_1 с окрашенными цветками в качестве P_2 (родителей второго поколения), размножить их путем самоопыления и получить потомство F_2 . Если от каждого растения P_2 получить достаточное количество растений F_2 , то оказывается, что среди потомков каждого P_2 у части растений цветки окрашены, а у части — цветки белые. Если пользоваться нашими обозначениями генетического материала, то F_2 должны содержать в себе либо C , либо (соответственно) c . Нет ничего удивительного в том, что некоторые F_2 содержат C , но откуда взялось c ? Можно для начала предположить,

что в этих случаях с либо возникает спонтанно из каких-то «негенетических» веществ, либо C мутирует в c . Можно обойти первое возможное объяснение ввиду сделанного ранее предположения (стр. 18), что генетический материал может возникать только из предшествующего генетического материала и что этот материал самовоспроизводится (реплицируется). Второе объяснение можно исключить на основании того факта, что в чистой линии, содержащей C , мутации к c встречаются в тысячи раз реже, чем частота c среди F_2 . Так что если, как мы предположили, P_2 (F_1) были бы генетически подобны растениям из чистой C -линии, то мутации не могли бы объяснить разницу в поведении при размножении P_1C и P_2C .

Результаты опытов с бобами, приведенные в первой главе, согласуются с точкой зрения, согласно которой генетический материал любого организма представляет собой одну неделимую единицу. В связи с отсутствием простого объяснения результатов, полученных на горохе, мы сталкиваемся с необходимостью постулировать, что *генетический материал не всегда состоит из одной неделимой единицы*. Появление c среди F_2 можно объяснить, сделав более сложное предположение: каждый P_2 (F_1) содержит не только C , но также и c . Иными словами, предполагается, что у некоторых особей генетический материал состоит из двух единиц. Назовем *геном единицу, или ограниченную часть, генетического материала*. Но если мы предположили, что пара генов имеется у каждого P_2 , то следует предположить, что и у всех других растений, участвующих в нашем эксперименте, тоже есть пара генов, поскольку в науке мы подчиняемся *закону экономии (правило Оккама)*, который утверждал, что для объяснения данного ряда фактов следует пользоваться минимумом гипотез или предположений. Итак, вместо того, чтобы иметь одни особи с парой генов, а другие — с одним, мы предположим, что все особи содержат в своем генетическом материале пару генов. Соответственно, две чистые линии и P_1 должны быть CC и cc , а все F_1 должны быть Cc . F_2 с белыми цветками должны быть cc .

Обратим теперь внимание на растения F_2 , которые представляют собой cc . Цветки у них белые и фенотипически не отличаются от цветков исходной чистой линии, которая использовалась как P_1 . И в самом деле, скрещивание неокрашенных F_2 как между собой, так и с любыми другими растениями с белыми цветками (с F_2 или с чистой линией) дает потомство только с белыми цветками. Иными словами, растения F_2 cc генотипически столь же чисты в отношении рассматриваемого признака, как и растения из чистой линии. И это несмотря на то, что оба c , имеющих в F_2 , побывали в растениях F_1 , где другим участником пары генов был C . Мы, следовательно, приходим к выводу, что c , переданный в F_2 , не изменился из-за того, что находился в F_1 в присутствии C , хотя он совершенно не проявлялся в фенотипе растений F_1 . Можно обобщить этот вывод и утверждать, что *природа и характер передачи любого гена не зависит от того, какой ген является его партнером*. Члены пары генов называют *аллелями* (генами-партнерами). Этот термин применяется также к альтернативным формам данного гена.

Так как каждый P_2 дает потомство F_2 как с окрашенными, так и с белыми цветками, то все P_2 обладают генотипом Cc , где C обязательно получен от CCP_1 , а c от ccP_1 . Таким образом, устанавливается, что потомку передается по одному и только одному гену из пары генов каждого родителя, так что *в процессе передачи участники родительской пары генов должны отделиться друг от друга или расщепиться*. При передаче спаренное или диплоидное состояние генов превращается в неспаренное или гаплоидное состояние. Однако в потомстве диплоидное состояние восстанавливается, так как гаплоидный генотип передают ему оба родителя.

Итак, мы приняли гипотезу, согласно которой пара генов расщепляется во время передачи потомству. С одинаковой ли вероятностью передаются

потомству оба родительских аллеля? Мы уже знаем на основании изучения F_2 , полученного путем самоопыления F_1Cc , что оба гена данного организма передаются потомству. Проверим теперь гипотезу, согласно которой оба участника пары генов передаются одинаково часто. Если это так, то родитель мужского пола F_1 должен в 50% случаев давать C , а в 50% — c . Точно так же в 50% случаев родитель женского пола F_1 будет давать C и в 50% — c . Предположим, наконец, что диплоидность восстанавливается случайным образом, т. е. гаплоидный ген одного родителя входит в потомство независимо от характера гаплоидного гена, полученного от другого родителя. Поэтому потомок, который получил C от отца (50% потомков) имеет равные шансы получить от матери как C , так и c , так что 25% всего потомства будут составлять CC и 25% Cc . Потомки, получившие c от отца (50% потомков), также с равной вероятностью могут получить от матери как C , так и c , следовательно и этот вклад в общее поколение будет составлять 25% Cc и 25% cc . Исходя из этих соображений, следует ожидать, что в F_2 должно быть 25% растений CC , 50% Cc и 25% cc . Это предсказание можно выразить в виде относительных частот несколькими способами: $1/4 CC : 1/2 Cc : 1/4 cc$, либо $1CC : 2Cc : 1cc$, либо $25CC : 50Cc : 25cc$. Как уже говорилось, CC и Cc фенотипически не отличаются: и у тех, и у других цветки окрашены, так что по фенотипу 75% F_2 должно иметь окрашенные цветки и 25% белые. Какая же относительная частота окрашенных и неокрашенных цветков наблюдается среди F_2 в действительности?

Теоретически у монеты имеется 50% шансов упасть гербом и 50% — решкой, однако ясно, что для того, чтобы получить примерно эти цифры, нужно подбросить монету достаточно много раз. Точно так же и в нашем случае для того, чтобы точнее проверить теоретически ожидаемое соотношение (75% окрашенных и 25% белых цветков), необходимо просмотреть достаточно большое число потомков. Поэтому вместо того, чтобы просматривать потомство только одного P_2 , следует собрать результаты по потомству всех P_2 . При этом оказывается, что действительный результат в F_2 (среди 929 растений 75,9% имело окрашенные цветки и 24,1% белые) очень близок к ожидаемому.

Следует подчеркнуть, что представление о спаренных, не влияющих друг на друга, расщепляющихся генах не зависит от того, какие конкретные фенотипические соотношения получаются в F_2 . Наличие или отсутствие соотношения фенотипов $3/4$ окрашенных : $1/4$ белых позволяет проверить правильность двух предположений: 1) каждый потомок с равной вероятностью может получить любой из двух гаплоидных продуктов расщепления генов родителей; 2) гаплоидные продукты от разных родителей, восстанавливая диплоидное состояние, соединяются случайным образом.

Если справедливы все сделанные до сих пор предположения, то растения F_2 с окрашенными цветками (они составляют 75% всех F_2) должны обладать одним из двух генотипов: $1/3 CC$, которые должны давать потомство как представители чистой линии CC , и $2/3 Cc$, которые должны давать потомство как особи F_1Cc . Действительно, если каждому растению F_2 с окрашенными цветками дать самоопылиться, то и в самом деле примерно $1/3$ дает F_3 с окрашенными цветками, в то время как $2/3$ дает F_3 как с окрашенными, так и с белыми цветками. Таким образом, теоретически ожидаемое соотношение генотипов в F_2 ($1/4 CC : 1/2 Cc : 1/4 cc$) полностью подтверждается экспериментально. Модель генов, предложенная для объяснения фенотипических результатов, обобщенно представлена на рис. 3—1. Обычно в этом месте изложения вводят два дополнительных термина. Гомозиготой называют организм, однородный по рассматриваемой паре генов (например, CC и cc), тогда как гетерозиготой, или гибридом, — особь, неоднородную в этом отношении (например, Cc).

Объективную проверку правильности гипотез, выдвинутых в этой главе, можно осуществить следующим способом. Растения F_1 с окрашенными

цветками скрещиваются с растениями с белыми цветками. Такое скрещивание в генетике обозначают $F_1 Cc \times cc$. В результате расщепления половина потомства должна получить от Cc -родителя C , а половина — c . Кроме того все потомство должно получить c от родителя cc . Поэтому в таком скрещивании следует ожидать появления в потомстве 50% генотипов CC и 50% cc , а следовательно отношение фенотипов должно составлять $1/2$ окрашенных цветков : $1/2$ белых. Такое соотношение и подтверждается экспериментально (85 окрашенных : 81 белых).

Насколько общий характер имеют установленные нами принципы? Пока они приложимы лишь к случаю генного контроля окраски цветов у садового гороха. Можно проверить все вышеизложенные идеи еще в шести случаях, используя шесть других признаков садового гороха, каждый из которых встречается в виде двух легко различимых альтернативных возможностей и удовлетворяет ранее описанным требованиям, предъявляемым к признакам, по которым нужно проводить скрещивания. Во всех случаях при скрещивании двух соответствующих чистых линий F_1 -гибриды оказались фенотипически однородными. Более того, при самоопылении F_1 получается F_2 , в котором имеет место ожидаемое соотношение генотипов (1 : 2 : 1).

Вспомним, что фенотип Cc не отличим от CC . В растениях Cc фенотипическое проявление c маскируется проявлением C . Способность гена проявлять себя фенотипически в присутствии другого аллеля обозначается термином *доминантность*. В случае окраски цветов C является *доминантным* геном по отношению к c , который соответственно *рецессивен*.

Следует отметить, что концепция гена не зависит от того, существует или не существует явление доминантности. В самом деле, проверка наших гипотез сделалась только сложнее из-за того, что C во всех отношениях полностью доминирует над c . В $F_1 Cc$ проявился лишь C и присутствие c удалось обнаружить только по появлению cc потомков при размножении F_1 . Далее, только при дальнейшем размножении F_2 растений с окрашенными цветками удалось определить, что $1/3$ из них была CC и $2/3$ — Cc . Следовательно, доминантность относится к фенотипическому проявлению генов в диплоидном состоянии и не имеет никакого отношения к их целостности, репликации и механизму передачи. В дальнейшем для удобства мы будем относить термины *доминантный* и *рецессивный* к самим генам. Необходимо только все время помнить о точном значении этих терминов.

Как уже упоминалось, для проверки универсальности концепции гена использовали шесть других признаков гороха. Во всех случаях оказалось, что в гибридах один из аллелей всегда доминантен по отношению к своему альтернативному аллелю. На основании этого можно было бы заключить, что доминантность представляет собой универсальное явление, так как оно было обнаружено для каждого из семи различных признаков садового гороха, контролируемых генами. Однако прежде чем делать такое заключение, рассмотрим данные о наследовании окраски оперения, полученные при разведении определенного вида кур. В данном случае скрещивание черных и белых дает сизых F_1 -потомков. Скрещивание двух сизых F_1 приводит к появлению в F_2 $1/4$ черных, $1/2$ сизых и $1/4$ белых потомков. Здесь, как мы видим, не происходит маскировки действия одного гена другим; так что полная доминантность не является общим правилом фенотипического проявления аллелей в гетерозиготах. Заметим, что при отсутствии доминантности или неполной доминантности можно с уверенностью определить генотип организма на основании его фенотипа.

Перекрестное оплодотворение дало возможность показать, что гены встречаются парами, которые после расщепления расходятся и затем соединяются (рекомбинируют), образуя пары в потомстве. Иными словами, представление о том, что генетический материал состоит из пар разъединимых единиц, основано на рекомбинации этих единиц у видов, способных

к перекрестному оплодотворению. Здесь надо рассмотреть значение термина *генетическая рекомбинация*. Очевидно, что для рекомбинации генетические единицы сами по себе вовсе не должны изменяться (мутировать). Это значит, что гены у особи с проявлениями генетической рекомбинации существовали и до рекомбинации. Организм с парой генов AA' после самооплодотворения, следующего за расщеплением, может в потомстве снова образовать сочетание AA' . Такой генотип не рассматривается как генетическая рекомбинация. Это скорее *восстановление (реконструкция)* первоначального расположения единиц. Однако самооплодотворение может при этих же условиях дать также AA или $A'A'$. Эти два генотипа представляют собой новые сочетания генов по сравнению с родительским сочетанием и поэтому считаются генетическими рекомбинантами. Так, в том случае, когда образуются «старые» и «новые» комбинации генов, лишь последний тип сочетания генов называют генетической рекомбинацией. Такое употребление этого термина следует считать разумным, если учесть ту важную роль, какую имеют новые комбинации для понимания природы генетического материала. (Действительно, нам удалось вывести принцип расщепления только потому, что в результате полового процесса возникают новые комбинации генов.) Соответственно генетическую рекомбинацию следует отождествить с любой пересортировкой или перегруппировкой генов, приводящей к их новому сочетанию. Любой процесс, способный вести к образованию новых сочетаний генетических единиц, подобно тому, как это происходит при расщеплении и оплодотворении, и является механизмом, обеспечивающим генетические рекомбинации.

Результаты рассмотренных в первой главе опытов по изучению фенотипов привели нас к гипотезе о существовании генетического материала, который способен копировать самого себя (реплицироваться), мутировать и передаваться из поколения в поколение. Опыты с горохом показали, что с помощью метода рекомбинации генетический материал может быть разделен на пары генетических единиц. Для изучения природы генетического материала можно применять помимо рекомбинаций и другие операции или методы. Если бы эти различные методы показали, что весь генетический материал делится на более мелкие единицы, то это не обязательно означало бы, что с помощью разных операций были обнаружены совершенно эквивалентные единицы. Так, если воспользоваться негенетической аналогией, то книгу (эквивалент всего генетического материала) можно расчленить на главы, страницы, параграфы, слова, буквы, иллюстрации и т. д. Каждая операция дает нам определенные сведения о книге, но разные единицы, с помощью которых ее можно описать, не обязательно идентичны или содержатся одна в другой.

Какое значение имеет открытие расщепляющихся аллелей для гипотезы, согласно которой хромосомы пред-

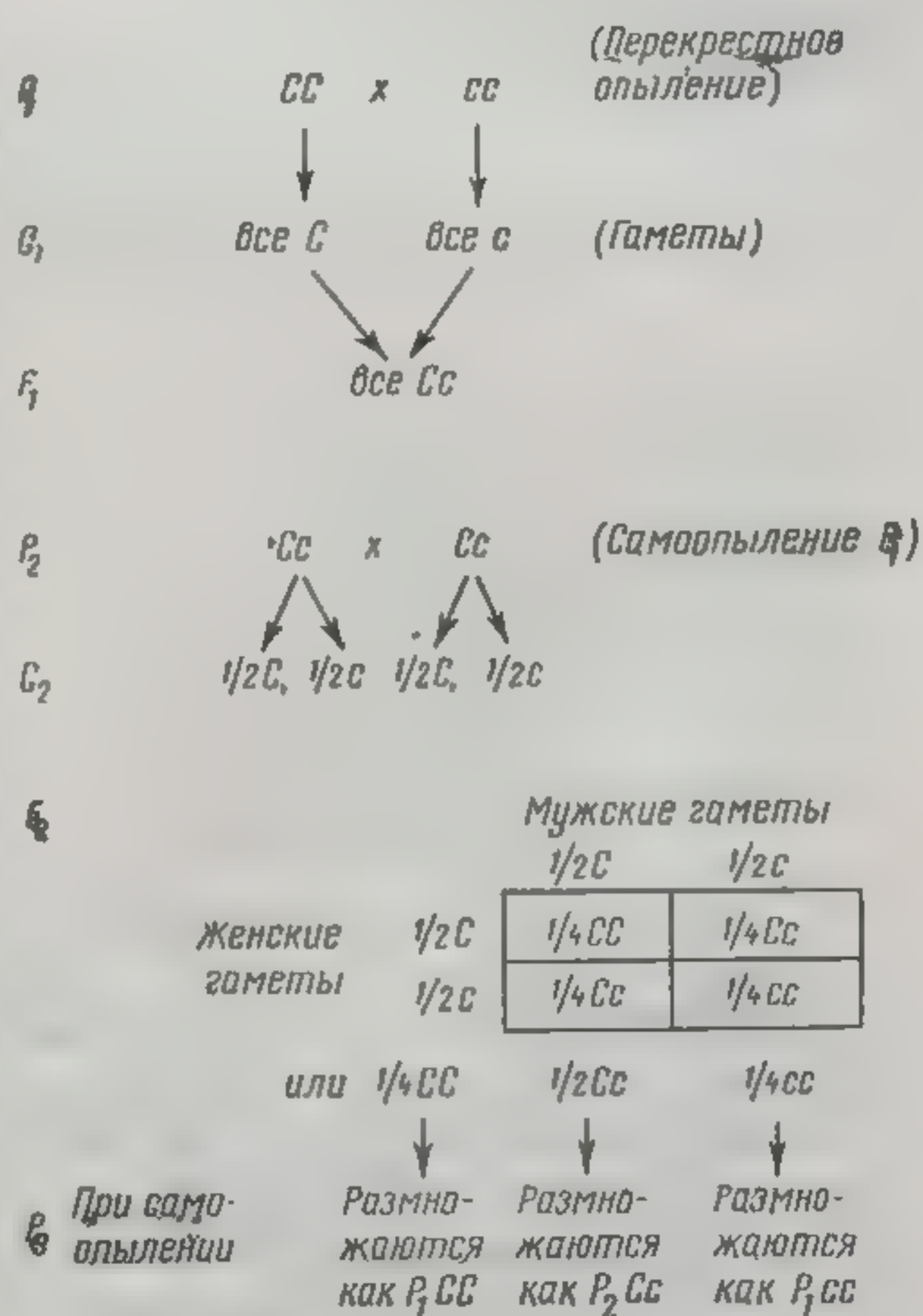


РИС. 3-1.

Генотипическая модель, объясняющая фенотипические результаты определенных скрещиваний растений гороха с окрашенными и неокрашенными цветками

ставляют собой генетический материал? Гены и геномы в целом неспарены в гаметах и спарены в зиготах. Может ли геном быть физической реализацией гена? Хотя гаметы содержат один геном, он обычно состоит (если забыть на время об обменах, приводящих к хиазмам) частично из копий материнских хромосом, а частично из копий отцовских хромосом. Расщепившиеся гены не несут в себе никаких следов от своих предыдущих аллелей и остаются точно такими же в гаметах, какими они были, попав в организм в результате оплодотворения; поэтому можно отбросить гипотезу, согласно которой материальным эквивалентом гена служит весь геном. Нельзя также считать геном одну целую хромосому, поскольку любая данная хромосома в гамете из-за обменов, приводящих к хиазмам, обычно состоит из частей как материнского, так и отцовского происхождения. Однако остается еще та возможность, что ген физически связан с определенным участком хромосомы, который настолько мал, что в нем не может произойти обмен, приводящий к хиазме, с соответствующим участком на гомологичной хромосоме. Такой участок после мейоза всегда будет полностью сохранять свой материнский или отцовский состав. Соответственно, максимальный размер такого неизменяющегося участка равняется максимальному размеру гена.

РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО АЛЛЕЛЬНЫМ ГЕНАМ У ЧЕЛОВЕКА

Принципы генетики, открытые при изучении садового гороха, должны распространяться также и на все другие размножающиеся половым путем виды, включая человека. Ввиду большого и естественного интереса к наследственности человека рассмотрим некоторые его признаки, которые могут определяться действием одной пары генов. Изучение генетики человека затрудняется тем обстоятельством, что, в отличие от других видов растений или животных, наш вид не разводится экспериментально. Ввиду этой методической трудности необходимы специальные методы исследования. К ним относятся анализ родословных, семей и популяций, а также изучение близнецов. Здесь мы будем иметь дело преимущественно с первыми двумя методами.

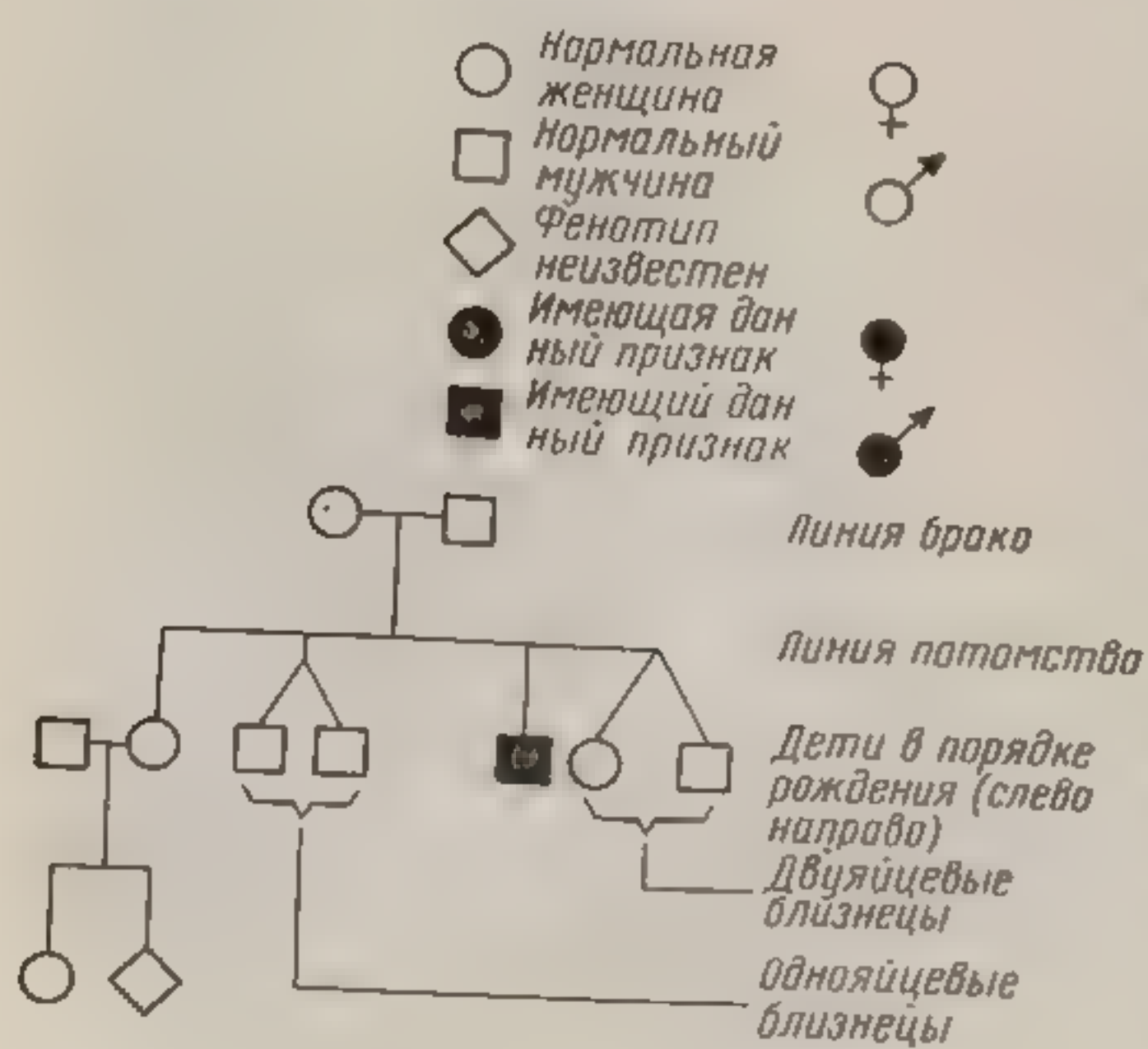


РИС. 3-2.

Обозначения, используемые при записи родословных человека

Для анализа родословных используют описания фенотипов семей (фамильное древо или генеалогия) в течение нескольких поколений. При записи родословных пользуются определенными условными обозначениями (рис. 3-2): квадрат или ♂ обозначает мужчину, а круг или ♀ — женщину. Закрашенные символы обозначают лиц с аномалией, рассматриваемой в данный момент. В семейном методе используются фенотипы только родителей и их детей, т. е. данные по одному поколению.

Альбинизм, или отсутствие меланинового пигмента, является редкой аномалией, которая встречается при рождении примерно одного ребенка из каждых 20 000. При изучении семей и родословных, примером которых служит

родословная факты. Все альбинизм

1. Оба родителя нормальной ного ребенка (Aa × Aa).

2. Альбинизм го предка. В меньше пяти лах от 20 до 5 и ген a. Вер если родители из родителей генов AA. С д то брак с род родителя окаж

3. Какого о собрать данные родители норм С точки зрения должны быть браке не будет низма равна 1/4. ность быть норм от генотипов, ни тому в 3/4 дуде мальным, а сред Таким образом, лями не входит в ребенка нормальн дующие типы дву (3/4) и вторым аль (3/4); семьи, в кото 3/4 всех семей, и н сами (1/4 от 1/4), чт в каждой семи изуч и 8 альбиносов (по т и два — от семей с неальбиносов к ал в действительн

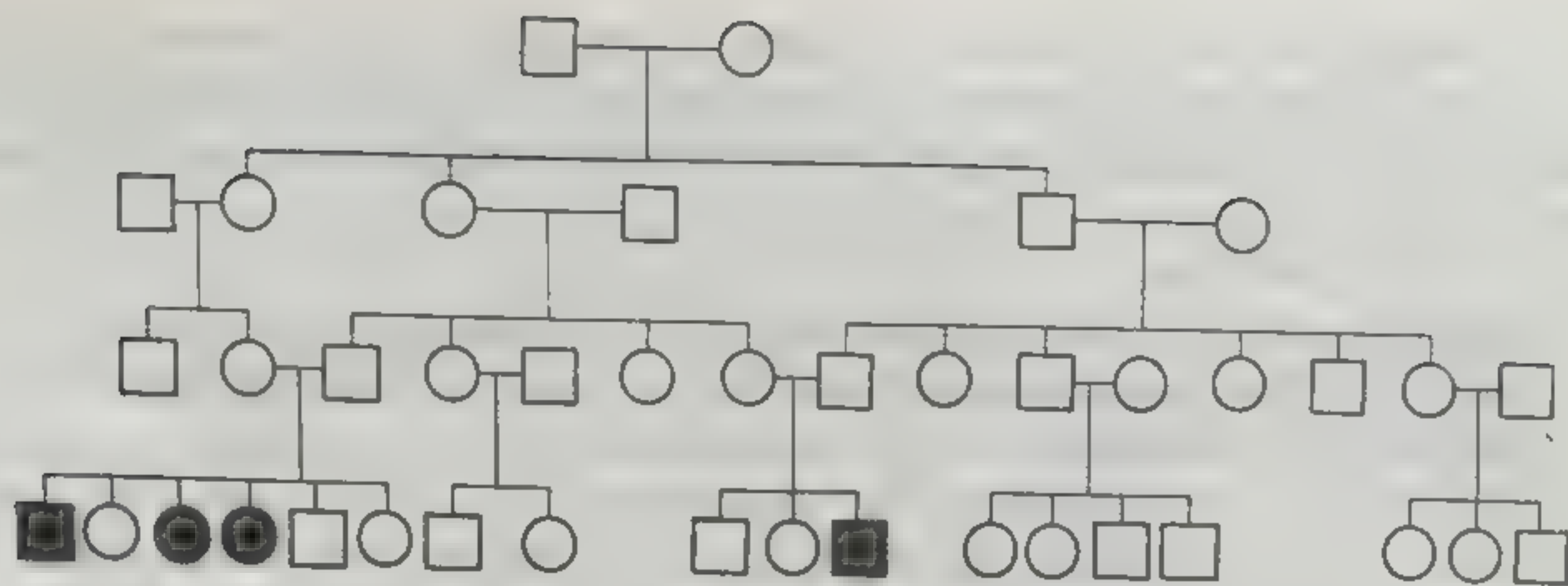


РИС. 3-3.

Родословная альбинизма у человека

родословная, приведенная на рис. 3-3, выявляются перечисленные ниже факты. Все они рассматриваются с точки зрения гипотезы, согласно которой альбинизм возникает у гомозигот по рецессивному гену a .

1. Оба родителя альбиноса могут не быть альбиносами, т. е. обладают нормальной пигментацией. Это можно объяснить появлением гомозиготного ребенка (aa) в браке двух гетерозиготных родителей неальбиносов ($Aa \times Aa$).

2. Альбиносы чаще всего встречаются в потомстве лиц, имеющих общего предка. В Швеции и Японии средний процент браков между кузенами меньше пяти; среди же родителей альбиносов этот процент лежит в пределах от 20 до 50. Так как альбинизм встречается редко, то редко встречается и ген a . Вероятность образования гомозиготной особи (aa) очень мала, если родители не состоят в родстве, так как даже в том случае, когда один из родителей несет гены Aa или aa , то у второго вероятнее всего будет пара генов AA . С другой стороны, если первый родитель несет гены Aa или aa , то брак с родственником увеличивает вероятность того, что у второго родителя окажется ген a , полученный от общего предка супругов.

3. Какого отношения альбиносов к неальбиносам можно ожидать, если собрать данные по семьям с двумя детьми, в которых несмотря на то, что родители нормальны, тем не менее в потомстве появлялись альбиносы? С точки зрения рассматриваемой нами гипотезы родители в таких семьях должны быть $Aa \times Aa$. Вероятность того, что первый ребенок в таком браке не будет альбиносом, равна $3/4$; соответственно вероятность альбинизма равна $1/4$. Каждый ребенок в таком браке имеет указанную вероятность быть нормальным или альбиносом. Эта вероятность не зависит ни от генотипов, ни от фенотипов предыдущих или последующих детей. Поэтому в $3/4$ двудетных семей с родителями Aa первый ребенок будет нормальным, а среди них $3/4$ будут иметь и второго нормального ребенка. Таким образом, $9/16$ всех семей с двумя детьми и гетерозиготными родителями не входит в рассматриваемую нами выборку, поскольку в них оба ребенка нормально пигментированы. В нашу выборку будут входить следующие типы двудетных семей: семьи с первым нормальным ребенком ($3/4$) и вторым альбиносом ($1/4$), что составляет $3/16$ от всех семей ($1/4$ от $3/4$); семьи, в которых имеется обратная ситуация ($3/4$ от $1/4$), что дает еще $3/16$ всех семей, и наконец семьи, в которых оба ребенка являются альбиносами ($1/4$ от $1/4$), что составляет $1/16$ всех семей. Следовательно, в среднем, в каждой семи изученных семьях с детьми альбиносами должно быть 6 нормальных детей (по три от каждого из двух типов семей с одним альбиносом) и 8 альбиносов (по три от каждого из двух типов семей с одним альбиносом и два — от семей с двумя альбиносами), так что ожидаемое отношение неальбиносов к альбиносам составляет 3 : 4. Соотношение, наблюдаемое в действительности, весьма близко к ожидаемому.

Соотношения альбиносов и неальбиносов, наблюдаемые в семьях с тремя, четырьмя или большим числом детей от нормальных родителей, также согласуются с ожидаемыми соотношениями, выведенными аналогичным образом.

4. В браке двух альбиносов рождаются только альбиносы, как это и следует по законам генетики для скрещивания $aa \times aa$

5. Близнецы, образовавшиеся из одной зиготы (*монозиготные*, однояйцевые, или *идентичные*, близнецы), либо оба являются альбиносами, либо оба имеют нормальную пигментацию. Поскольку обычно такие близнецы генетически идентичны, то следует ожидать, что оба они будут либо нормальными AA или Aa , либо оба альбиносами aa . Близнецы, происходящие из разных зигот (*дизиготные*, *неидентичные*, *двухяйцевые* близнецы), обладают не большей вероятностью быть одинаковыми по признаку альбинизма, чем любые два ребенка одних родителей.

Эти данные четко доказывают, что альбиносы обычно являются гомозиготными рецессивами по одной паре расщепляющихся генов.

Шерстистые (woolly) *волосы* являются редкой аномалией, встречающейся у норвежцев. На основании изучения родословных ее можно объяснить наличием редкого доминантного гена, который обозначается через W . Если один из супругов обладает шерстистыми волосами (Ww), а у другого (ww) волосы нормальные, то можно ожидать (в действительности так и оказывается), что примерно у 50% детей волосы шерстистые, а у 50% — нормальные. Обратите внимание, что родитель с аномалией обозначен как гетерозигота. Поскольку данный признак очень редок, то гомозигот WW , по-видимому, вообще не существует: ребенок WW может родиться (если не учитывать возникновения мутаций) только в том случае, когда оба его родителя имели шерстистые волосы.

Наконец, рассмотрим генетическую природу некоторых видов анемий. Среди итальянцев (как живущих на родине, так и эмигрировавших в другие страны) встречаются анемии двух типов. Один тип тяжелый, обычно со смертельным исходом в детстве, называется *анемией Кули*, или *большой талассемией*. Другой тип более умеренной анемии называется *микроцитемией*, или *малой талассемией*. Анализ родословных и семей показывает, что оба родителя детей, страдающих большой талассемией, больны малой талассемией. Все данные согласуются с гипотезой, согласно которой лица, больные большой талассемией, гомозиготны (tt) по паре генов, а лица, страдающие малой талассемией, гетерозиготны по этому гену (Tt). В Италии более 100 000 людей были идентифицированы как TT , Tt или tt . Заметим, что в случае талассемии ни T , ни t не являются полностью доминантными или рецессивными генами.

Следует напомнить, что при взаимодействии генов в гетерозиготах, влияющем на фенотипическое выражение, может иметь место полная или частичная доминантность, а также ее отсутствие и тем не менее проявление генов не оказывает ни малейшего влияния ни на их целостность, ни на расщепление и рекомбинацию.

Анализ родословных и семей позволяет изучить большое число других признаков и на основании известных свойств генов объяснить полученные данные генетически, пользуясь самыми простыми подходящими объяснениями, как это было показано здесь для альбинизма и других признаков. К сожалению, иногда данных оказывается недостаточно и исследователь приходит к нескольким одинаково вероятным генетическим объяснениям.

Законченный
Ген
обнаружен
гарах
наний.
Гены
ходит
каждый
нику
ген
другого
рой
себе: ген,
себе в
даль обмен
Данные,
ют о том,
ляющихся
ВОПРОСЫ ДЛ
3.1. Как
чески чистой
3.2. Как
никновения
3.3. В чем
3.4. Теряе
когда передае
3.5. Необх
сами себя? По
3.6. Переч
на основании
3.7. Скреп
только чернот
в основном че
результаты г
3.8. При с
потомство с к
обозначения.
ветствующие
3.9. Какие
теризуйте раз
3.10. Како
3.11. Имею
Разъясните св
3.12. Како
пическим аффе
3.13. Согла
яне двух раст
обладающее то
3.14. Автор
ность» и его п
3.15. В чем
3.16. Какие
внам) обусловл

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ген является единицей или частью полного генетического материала, обнаруженной с помощью различных методических приемов. Гены, о которых шла речь в этой главе, были обнаружены с помощью рекомбинаций.

Гены встречаются парами. Когда при половом размножении происходит передача генов, участники пары генов расщепляются так, что каждый потомок получает от каждого родителя только по одному участнику этой пары. Ген остается неизменным независимо от того, какой ген был его аллелем до расщепления, и от того, какой ген получен от другого родителя. Удастся конкретизировать гипотезу, согласно которой хромосомы являются генетическим материалом или несут его в себе: ген, обнаруженный с помощью рекомбинаций, можно представить себе в виде короткого участка хромосомы, в котором не могут происходить обмены, приводящие к хиазмам.

Данные, собранные при изучении родословных и семей, свидетельствуют о том, что ряд признаков человека обусловлен действием пары расщепляющихся генов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Как можно установить, стала ли линия садового гороха генетически чистой в отношении данного признака?

3.2. Какие возражения можно выставить против предположения о возникновении генов только из предшествующих генов, но не *de novo*?

3.3. В чем разница между фенотипией и перекрыванием фенотипов?

3.4. Теряет ли родитель свой собственный генетический материал, когда передает его потомству? Дайте обоснованный ответ.

3.5. Необходимо ли предполагать, что гены способны воспроизводить сами себя? Поясните.

3.6. Перечислите все предположения, необходимые для объяснения на основании модели генов отношения 3 : 1 в F_1 .

3.7. Скрещивание черных морских свинок с белыми дает потомство только черного цвета. При скрещивании двух таких потомков рождаются в основном черные, а также некоторое количество белых. Объясните эти результаты генетически.

3.8. При скрещивании двух растений с розовыми цветками получилось потомство с красными, розовыми и белыми цветками. Введите генетические обозначения. Напишите для этого случая все возможные генотипы и соответствующие им фенотипы.

3.9. Какие методы изучения генов использованы в этой главе? Охарактеризуйте размеры гена.

3.10. Какова роль доминантности в изучении генов?

3.11. Имеются ли гены у организмов, размножающихся бесполом путем? Разъясните свой ответ.

3.12. Каково взаимоотношение между геном и связанным с ним фенотипическим эффектом?

3.13. Согласны ли вы с утверждением (стр. 40) о том, что скрещивание двух растений садового гороха с белыми цветками дает потомство, обладающее только белыми цветками?

3.14. Автор этой книги старается не употреблять слово «наследственность» и его производные. Считаете ли Вы это оправданным и почему?

3.15. В чем разница между методами анализа родословных и семей?

3.16. Какие данные свидетельствуют о том, что пигментация (альбинизм) обусловлена расщепляющимися генами?

3.17. В браке двух нормальных родителей рождается ребенок-альбинос. Какова вероятность того, что следующий ребенок будет альбиносом? неальбиносом? Какова вероятность того, что оба следующих ребенка будут альбиносами? оба не будут альбиносами? один будет альбиносом, а другой нет?

3.18. В какой части семей с тремя детьми, где оба родителя гетерозиготны по гену альбинизма, не будет детей альбиносов? все дети будут альбиносами? по крайней мере один ребенок будет альбиносом?

3.19. Является ли ген, определяющий появление шерстистых волос, полностью доминантным по отношению к гену нормальных волос? Поясните.

3.20. В чем сходство и различие в расщеплении генов и хромосом?

3.21. Если генетический материал располагается в хромосомах, то необходимо ли предполагать, что участники пары генов занимают точно соответствующие друг другу места в гомологичных хромосомах? Почему необходимо такое предположение?

3.22. Если митотическая хромосома содержит в норме две идентичных хроматиды, можем ли мы решить, сколько генов содержит каждая хромосома: один ген или пару идентичных генов? Аргументируйте свой ответ.

3.23. В чем, по Вашему мнению, может быть источник ошибок при рассмотрении семей с двумя детьми? Как бы Вы попытались избежать ошибки?

3.24. Электронный микроскоп позволяет различить в головках спермиев некоторых видов массу тонких нитей. Служит ли это доводом против сохранения целостности хромосом или генов? Почему?

3.25. В чем разница между генетическими рекомбинациями, которые происходят в момент оплодотворения и во время мейоза?

3.26. В чем разница в изучении генетики на уровне клетки и на уровне организма?

3.27. В каком окружении находится каждый отдельный ген?

3.28. В родословных некоторых семей в Швеции встречаются случаи потери нейромышечной координации, атаксии. Почему одна форма этой редкой аномалии встречается в семьях, где родители явно не являются родственниками, а другая форма, — в семьях, где родители являются кузенами?

3.29. Что можно сказать на основании приведенных ниже фактов относительно того, насколько общий характер носят явления доминантности?

При скрещивании растений с морщинистыми семенами и растений с гладкими семенами все семена F_1 оказываются гладкими. Микроскопическое исследование показывает, что края крахмальных зерен у гладких семян P_1 также гладкие, сильно зазубрены у всех морщинистых P_1 и слегка зазубрены у всех F_1 .

ЛИТЕРАТУРА

R. R. Gates. Human Genetics, N. Y., 1946, 2 vols.

O. L. Mohr. Woolly hair a dominant character in man. 1932, 23, 345.

J. V. Neel and W. J. Schull. Human Heredity. Chicago, 1954, p. 83, 89, 240. (Дж. Ниль и У. Шулл. Наследственность человека. М., ИЛ, 1958.)

К. Штерн [C. Stern.] Основы генетики человека. Изд. «Медицина», 1965.

В предыдущих
терминатив по
можно объяс
что будет пре
тах по скрещ
него числа п
нительных о
Вначале был
ному в треть
ляются кажд
с гладкими с
щинистыми с
семян домини
ром число р
с морщинист
линии желты
нами, т. е. же
 F_1 дает в F_2
Что же пр
временно по
гладкие желт
ми, причем га
гладкие желт
ожидать, если
санном случа
типическое п

При самос
потомство, в к
различные фе
желтые) : 3 (г
стые зеленые).
ние и рекомби

НЕЗАВИСИМАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ

В предыдущих главах рассматривалась трансмиссионная генетика альтернатив по одному признаку. Оказалось, что все известные случаи можно объяснить существованием одной пары генов. Возникает вопрос, что будет представлять собой генетическая единица передачи, если в опытах по скрещиванию одновременно проследивать судьбу двух или большего числа признаков. Ответ на этот вопрос дают результаты ряда дополнительных опытов, поставленных Грегором Менделем на садовом горохе. Вначале было установлено, что подобно признаку окраски цветка, описанному в третьей главе, форма семян и цвет семян по отдельности определяются каждый одной парой генов. Это значит, что P_1 из чистой линии с гладкими семенами дает при скрещивании с P_1 из чистой линии с морщинистыми семенами потомство F_1 с гладкими семенами, т. е. ген гладких семян доминирует. Самоопыление F_1 с гладкими семенами дает F_2 , в котором число растений с гладкими семенами относится к числу растений с морщинистыми семенами, как 3 : 1. Аналогично скрещивание чистой линии желтых семян с чистой линией зеленых дает F_1 с желтыми семенами, т. е. желтая окраска доминирует над зеленой. Самоопыление желтых F_1 дает в F_2 отношение 3 (желтые) : 1 (зеленое).

Что же произойдет при скрещивании растений, отличающихся одновременно по обоим признакам? Скрещиваются P_1 из линии, дающей гладкие желтые семена, с P_1 из линии с морщинистыми зелеными семенами, причем гарантируется чистота обеих линий. В F_1 получаются только гладкие желтые семена (табл. 4—1). Этого результата можно было бы ожидать, если бы мы изучали форму и цвет семян по отдельности. В описанном случае нет доминирующего действия одного признака на фенотипическое проявление другого.

Таблица 4—1
 ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
 ПРИ ОДНОВРЕМЕННОМ ИССЛЕДОВАНИИ
 ДВУХ ПРИЗНАКОВ

| P_1 Гладкие желтые × Морщинистые зеленые | | |
|---|-------|-----------|
| F_1 Все гладкие желтые | | |
| P_2 F_1 Гладкие желтые × Гладкие желтые | | |
| Фенотип | Число | Пропорция |
| Гладкие желтые | 315 | 9,06 |
| Гладкие зеленые | 101 | 2,9 |
| Морщинистые желтые . . . | 108 | 3,1 |
| Морщинистые зеленые | 32 | 0,9 |

При самоопылении F_1 с гладкими желтыми семенами получается потомство, в котором при подсчете достаточно большого числа растений различные фенотипы встречаются в соотношении примерно 9 (гладкие желтые) : 3 (гладкие зеленые) : 3 (морщинистые желтые) : 1 (морщинистые зеленые). Заметим, что по каждому признаку произошло расщепление и рекомбинация, что видно из анализа F_2 , в котором имеет место

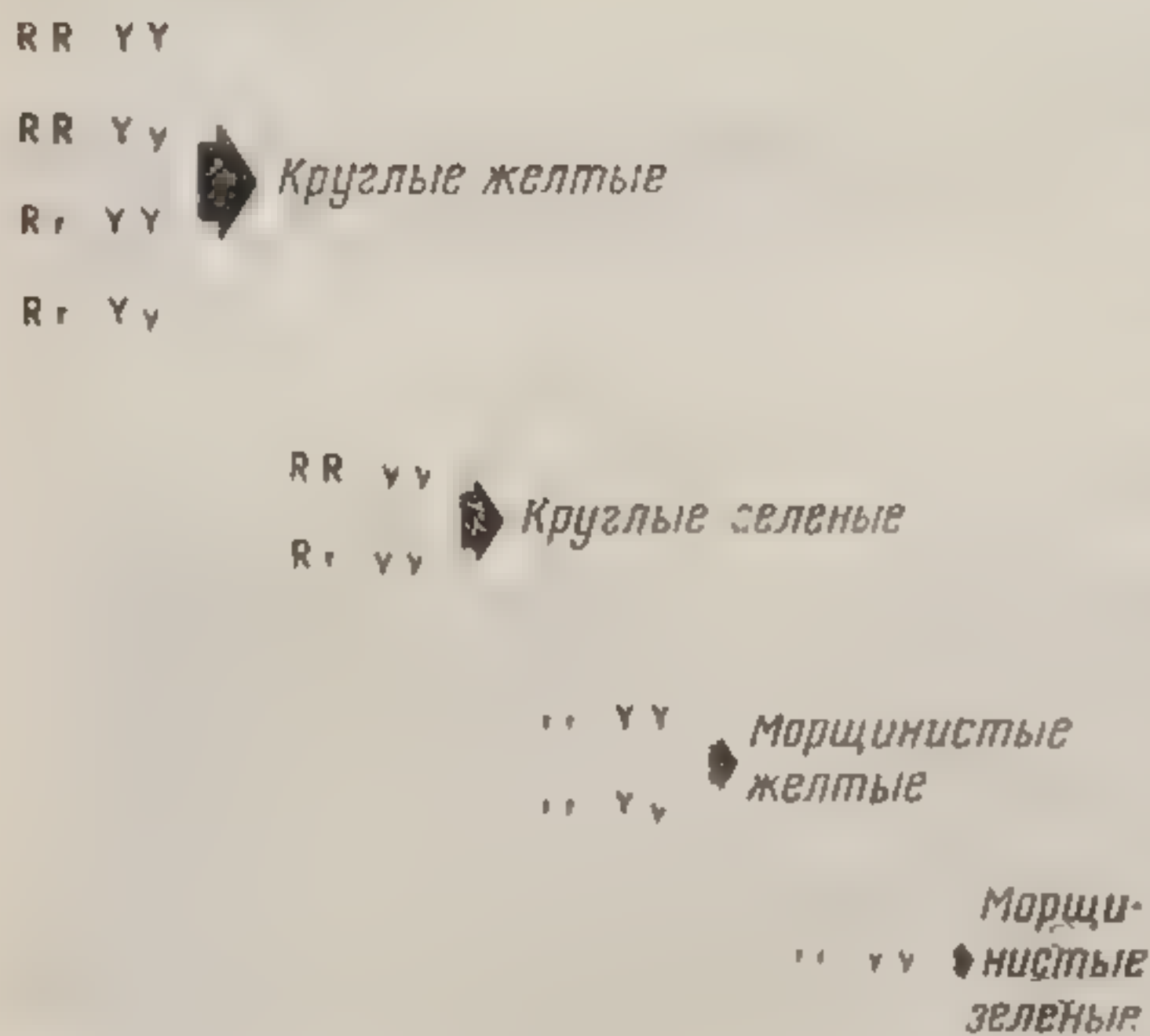


РИС. 4-1.

Генотипы и фенотипы в F_2 , возникающие в результате расщепления

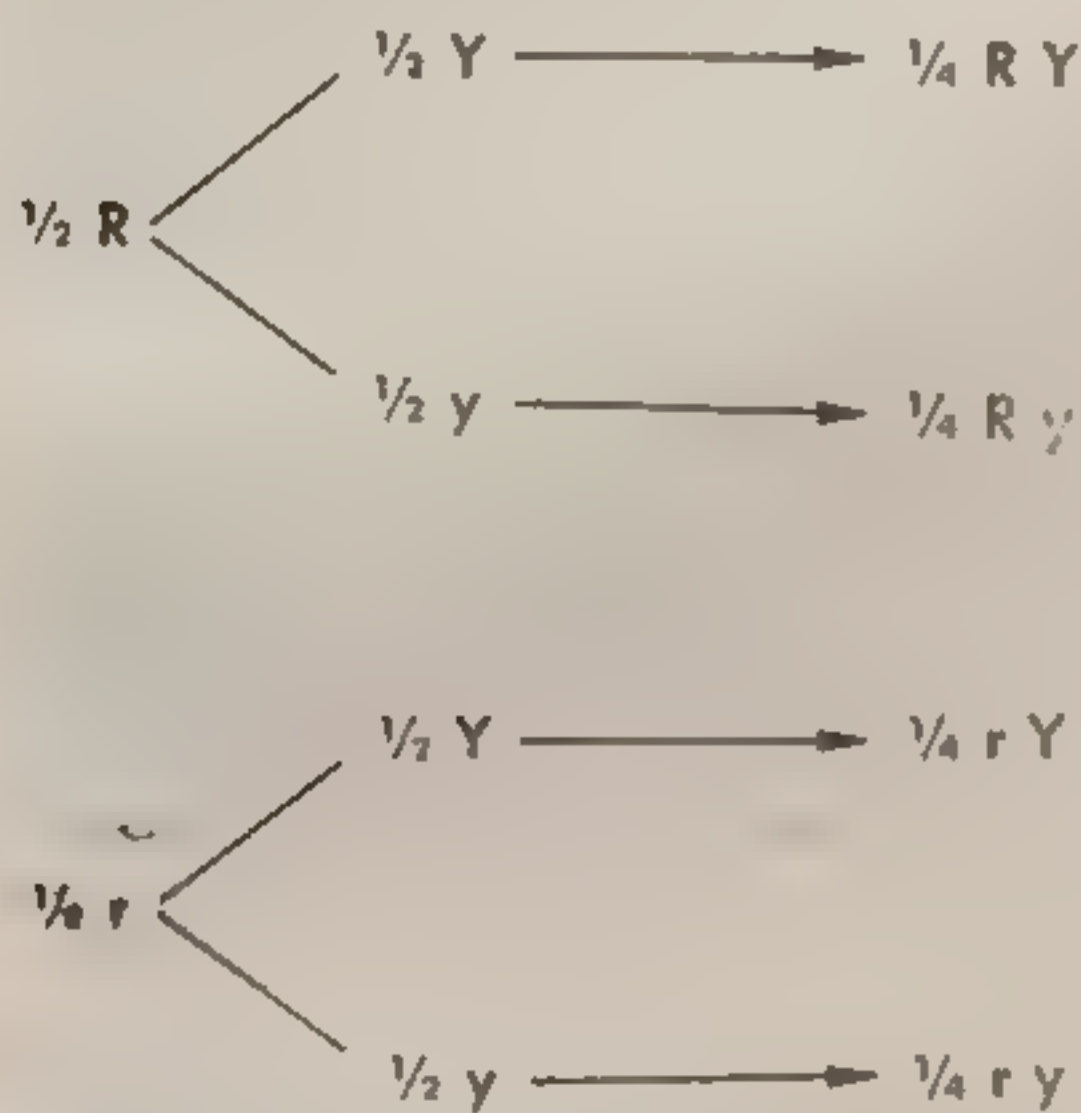


РИС. 4-2.

Генотипы гамет, образуемых дигибридом $RrYy$ при независимом расщеплении

Генетический материал состоит не из одной пары неделимых единиц, а из разделимых пар единиц или генов, причем каждая пара по отдельности способна к расщеплению, и к рекомбинации.

Предположим поэтому, что в каждом организме, размножающемся половым путем, имеется больше одной пары генов. Пусть в нашем конкретном случае R (гладкие семена) и r (морщинистые семена) будут аллелями одной пары генов, а Y (желтые семена) и y (зеленые семена) — аллелями второй пары. Тогда растения P_1 представляют собой $RRYY$ (гладкие желтые) и $rryy$ (морщинистые зеленые). Каждая пара генов расщепляется так, что в гаметы попадает лишь по одному участнику каждой пары. Первый родитель, таким образом, даст только гаметы RY , а второй только ry и все F_1 будут представлять собой $RrYy$ (гладкие желтые), что и наблюдается в действительности.

Согласно нашей рабочей гипотезе, гаметы, образуемые растениями F_1 , будут содержать либо R , либо r и, кроме того, либо Y , либо y . Поскольку

соотношение 12 (гладкие) : 4 (морщинистые) : 12 (желтые) : 4 (зеленые). Таким образом, и в этом поколении не наблюдается влияния одного признака на расщепление и рекомбинацию генетического материала, ответственного за другой признак.

Какие еще сведения о гене можно извлечь из этих результатов? До сих пор все экспериментальные данные можно было объяснить с помощью всего лишь одной пары генов, допуская, что полный генетический материал диплоидной клетки делится только на два гена, причем оба обладают многочисленными аллелями, каждый из которых влияет на большое число разных признаков. Будем поэтому по-прежнему считать, что все особи P_1 в данном случае содержат только одну пару генов и каждый ген одновременно влияет на два признака: на форму и окраску семян. Полученные данные согласуются с этим предположением в том отношении, что F_1 имеют гладкие желтые семена, а F_2 желтые и зеленые, так же как и гладкие и морщинистые встречаются в соотношении 3 : 1. По нашей гипотезе, в F_2 должно быть только два типа семян в соотношении 3 (гладкие желтые) : 1 (морщинистые зеленые). На самом же деле в F_2 встречаются не только эти прародительские сочетания (P_1), но и два новых рекомбинантных типа потомков, а именно, гладкие зеленые и морщинистые желтые! Очевидно, передаваемый потомству генети-

наблюдения над F_2 с той же гаметой (так и четыре вероятных генотипа будут встречаться в соотношении 9 различных генотипов и соотношении 9 различных фенотипов, два — «гладкие морщинистые зеленые» обнаруживается 4 фенотипический материал, по каждой из которых можно получить 9 : 3 : 3 : 1? Для этого в соответствии с этим растением $RrYy$ получаем еще и y . Другая половина F_2 образуют из особей P_2 состоять из 16. Отсюда, как мы видим, получается диаграмма, начинающаяся с RY (что даст 1).

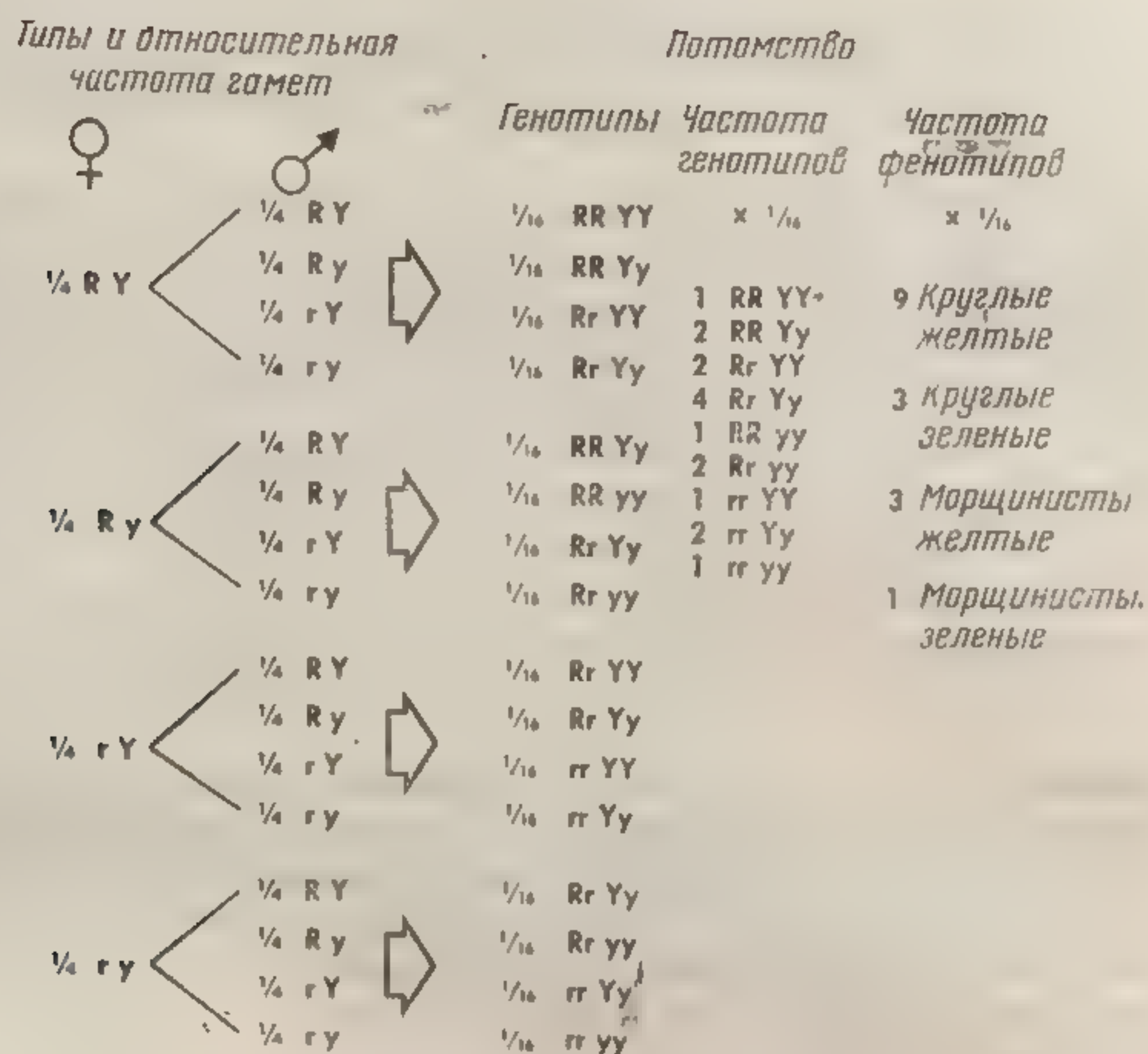


РИС. 4-3

Независимое расщепление и случайное оплодотворение в скрещивании идентичных дигибридов

наблюдения над F_2 свидетельствуют, что R и Y не всегда попадают в одну и ту же гамету (так же как и r и y), то среди гамет должны встречаться четыре вероятных генотипа: RY , Ry , rY , ry . Эти возможные гаплоидные генотипы будут встречаться и в мужских, и в женских гаметах. Поэтому можно ожидать, что в F_2 появятся изображенные на рис. 4—1 диплоидные генотипы и соответствующие им фенотипы. Заметим, что в F_2 возможны 9 разных генотипов, четыре из которых дают фенотип «гладкие желтые», два — «гладкие зеленые», два — «морщинистые желтые» и один — «морщинистые зеленые». Это согласуется с тем, что в F_2 действительно обнаруживается 4 фенотипа и подтверждает гипотезу, по которой генетический материал, передаваемый через гаметы, состоит из субъединиц, каждая из которых обладает свойствами неаллельного гена.

Как же можно объяснить наблюдаемое в F_2 соотношение фенотипов 9 : 3 : 3 : 1? Для этого достаточно допустить, что расщепление одной пары генов происходит независимо от расщепления другой пары генов. В соответствии с этим предположением (рис. 4—2) половина всех гамет растения $RrYy$ получает R , причем половина из них получает еще и Y , а половина y . Другая половина гамет получает r и половина из них получает еще и Y , а половина y . Таким образом, популяция мужских гамет в P_2 будет состоять из 25% RY , 25% Ry , 25% rY и 25% ry . Женские особи P_2 образуют гаметы тех же генотипов и в тех же соотношениях. Оплодотворение, как мы уже предполагали, происходит случайным образом. Отсюда получается ожидаемый состав F_2 , изображенный на рис. 4—3.

Расходящиеся диаграммы, изображенные на рис. 4—3, можно рассматривать начиная сверху: $\frac{1}{4}$ женских гамет представляет собой RY и в $\frac{1}{4}$ случаев оплодотворяется мужскими гаметами RY (что дает $\frac{1}{16}$ потомков $RRYY$), в $\frac{1}{4}$ случаев оплодотворение совершит мужская гамета Ry (что даст $\frac{1}{16}$ потомков $RRYy$) и т. д. Просуммировав одинаковые классы,

Родитель

$Rr Yy \times Rr Yy$

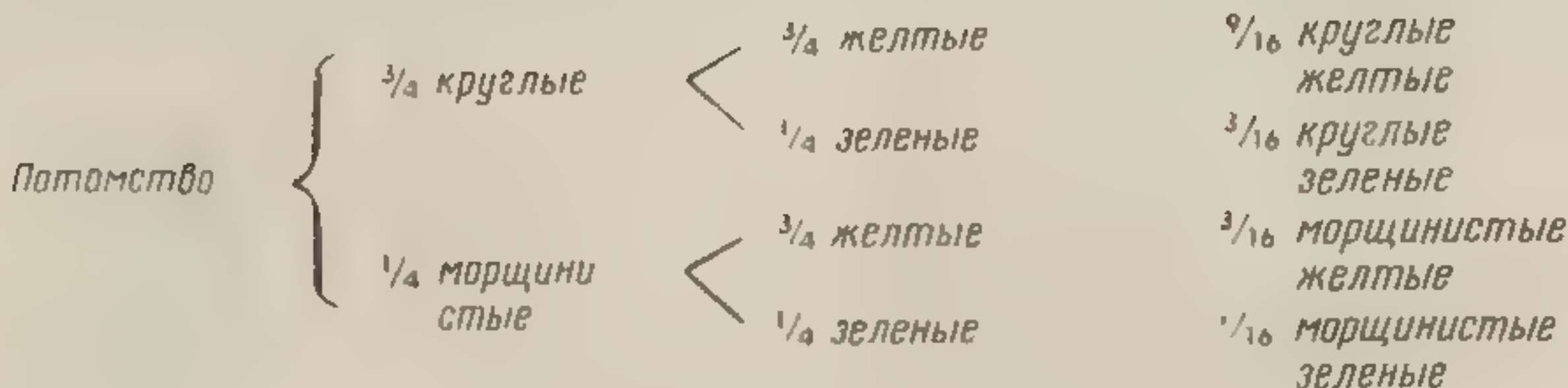


РИС. 4-4.

Фенотипические результаты скрещивания идентичных дигибридов

можно получить изображенные на схеме типы и относительные частоты разных генотипов и фенотипов. Наблюдаемые в действительности соотношения (табл. 4—1) полностью совпадают с ожидаемыми.

Еще проще получить фенотипическое соотношение $9 : 3 : 3 : 1$, используя расходящиеся диаграммы. Мы знаем, что скрещивание двух идентичных моногибридов (гетерозигот только по одной из рассматриваемых

| Гаметы | | Генотипы | | Фенотипы | |
|------------------|------------------|---------------------|--|-----------------------------------|--|
| ♀ | ♂ | | | | |
| $\frac{1}{4} RY$ | $\frac{1}{4} rY$ | $\frac{1}{4} Rr Yy$ | | $\frac{1}{4}$ Круглые желтые | |
| $\frac{1}{4} Ry$ | $\frac{1}{4} ry$ | $\frac{1}{4} Rr yy$ | | $\frac{1}{4}$ Круглые зеленые | |
| $\frac{1}{4} rY$ | $\frac{1}{4} rY$ | $\frac{1}{4} rr Yy$ | | $\frac{1}{4}$ Морщинистые желтые | |
| $\frac{1}{4} ry$ | $\frac{1}{4} ry$ | $\frac{1}{4} rr yy$ | | $\frac{1}{4}$ Морщинистые зеленые | |

РИС. 4-5.

Анализирующее скрещивание F_1 дигбрида ($RrYy$) с двойным рецессивом ($rryy$)

пар генов) дает соотношение фенотипов $3 : 1$ для доминантного и рецессивного признаков соответственно. Если имеется две пары генов, из которых каждая гетерозиготна и в каждой наблюдается явление доминантности, то, при условии независимого поведения этих двух пар генов при рекомбинации, можно скомбинировать два независимых отношения $3 : 1$, как это показано на рис. 4—4. Эту схему следует читать следующим образом: среди потомков, $\frac{3}{4}$ которых имеют гладкие семена (в результате расщепления, случайного оплодотворения и доминирования R в скрещивании $Rr \times Rr$), будет, кроме того, $\frac{3}{4}$ растений с желтыми семенами и $\frac{1}{4}$ с зелеными (вследствие расщепления, случайного оплодотворения и доминирования Y в скрещивании $Yy \times Yy$); поэтому у $\frac{9}{16}$ всего потомства будут гладкие желтые семена, а у $\frac{3}{16}$ гладкие зеленые и т. д.

Мы видим, следовательно, что независимое расщепление двух пар генов приводит к образованию гамет, среди которых с одинаковой частотой возникают как новые, так и старые комбинации генов. В нашем случае дигибрид F_1 (гетерозигота по двум из рассматриваемых пар генов) получил R и Y от одного родителя, а r и y от другого. Рекомбинантные формы гамет в этом случае представляют собой Ry и rY . Если бы дигиб-

рид F_1 получил от одного родителя Ry , а от другого rY , то рекомбинантными формами были бы RY и ry , а старыми комбинациями — Ry и rY . Таким образом, независимо от того, как гены попали в данный организм, дигибрид образует четыре генетически отличающихся типа гамет в равных количествах.

Еще проще можно определить типы и частоты гамет, образуемых дигибридом $RrYy$, если провести его скрещивание с *двойным рецессивом*, т. е. с гомозиготой по обоим рассматриваемым рецессивным генам. В скрещивании $RrYy \times rryy$ дважды рецессивный родитель дает гаметы только ry типа, тогда как дигибрид дает с равной частотой четыре типа гамет, а именно RY , Ry , rY , ry . Среди потомков такого скрещивания в опыте действительно было обнаружено (рис. 4—5) примерно 25% растений с гладкими желтыми семенами (55 потомков), 25% с гладкими зелеными (51 потомок), 25% с морщинистыми желтыми (49 потомков) и 25% с морщинистыми зелеными (52 потомка). Этот факт является прямым подтверждением как расщепления участников одной пары генов, так и независимости этого расщепления.

Когда мы имеем дело с полной доминантностью, скрещивание с рецессивом по рассматриваемой паре генов всегда дает возможность идентифицировать генотип другого родителя, так как фенотипы и их частоты среди потомков прямо соответствуют генотипам и их частотам среди гамет исследуемого родителя. Поэтому скрещивания такого рода называют *анализирующими*. Если один из родителей в серии скрещиваний гомозиготен по изучаемым рецессивным генам, то анализирующее скрещивание называется *возвратным*.

Теперь мы можем снова вернуться к рассмотрению материальной основы генов. Пусть одна пара генов физически связана с соответствующими короткими сегментами двух гомологичных хромосом, в пределах которых не могут возникать обмены, приводящие к хиазмам. Тогда возникает вопрос, где относительно первой пары генов располагается вторая? Возможны два варианта: обе пары генов находятся либо на одной паре хромосом, либо на двух разных. Рассмотрим последнюю возможность, а именно, что разные пары генов располагаются в разных негомологичных парах хромосом. Тогда в метафазе I мейоза сегменты негомологичных пар хромосом могут расположиться друг относительно друга несколькими разными способами (рис. 4—6).

Ранее было установлено, что разные пары хромосом располагаются в метафазе I независимо друг от друга. Более того, весьма вероятно, что на ориентацию центромер относительно веретена тетрад в метафазе I и диад в метафазе II не влияет наличие или отсутствие в них хиазм или обменов. Если между центромерой и парой генов Aa или между центромерой и парой генов Bb не происходит обмена и, следовательно, не возникает хиазмы, то в конце мейоза образуется равное количество четырех разных типов гамет, поскольку варианты I и II равновероятны (рис. 4—6, случай A). Тот же результат получается в случае B , когда в одной тетраде имеется хиазма между центромерой и рассматриваемым геном, а в другой тетраде ее нет, и в случае B , когда хиазмы возникают в обеих тетрадах. И в случае BI и в случае BII диады в метафазе II могут ориентироваться относительно полюсов четырьмя равновероятными способами, причем каждый из них приводит к одному и тому же результату: образованию с одинаковой частотой четырех типов гамет. Таким образом, независимое расщепление разных пар хромосом может служить физической основой независимого расщепления разных пар генов как в том случае, когда образуются хиазмы, так и в том случае, когда они не образуются.

Рассмотрим теперь следствия, вытекающие из предположения, что A и B располагаются на одной хромосоме, а их аллели a и b — на другой, гомологичной хромосоме (рис. 4—7). В случае A , когда между двумя парами

генов отсутствуют хиазмы, в гаметах встречаются только старые (отцовские и материнские) комбинации. В случае *Б*, когда между двумя разными парами генов образовалась хиазма, в гаметах с одинаковой вероятностью встречаются все четыре класса (две старые и две новые комбинации генов). Но если хиазма возникает не во всех тетрадах, то число гамет со старыми комбинациями генов будет превышать число гамет с новыми комбинациями. Тетрада обычно имеет одну или несколько хиазм; однако обмен, приводящий к хиазме, мог бы произойти во множестве участков по длине хромосомы. Поэтому, если поставить условием, чтобы в данном интервале, например между *A* и *B*, во всех тетрадах обязательно возникали хиазмы, то необходимо вводить дополнительные предположения. Кроме того, мы ничего не знаем о *генном интервале*, или расстоянии между неаллельными генами, которые, по нашему пред-

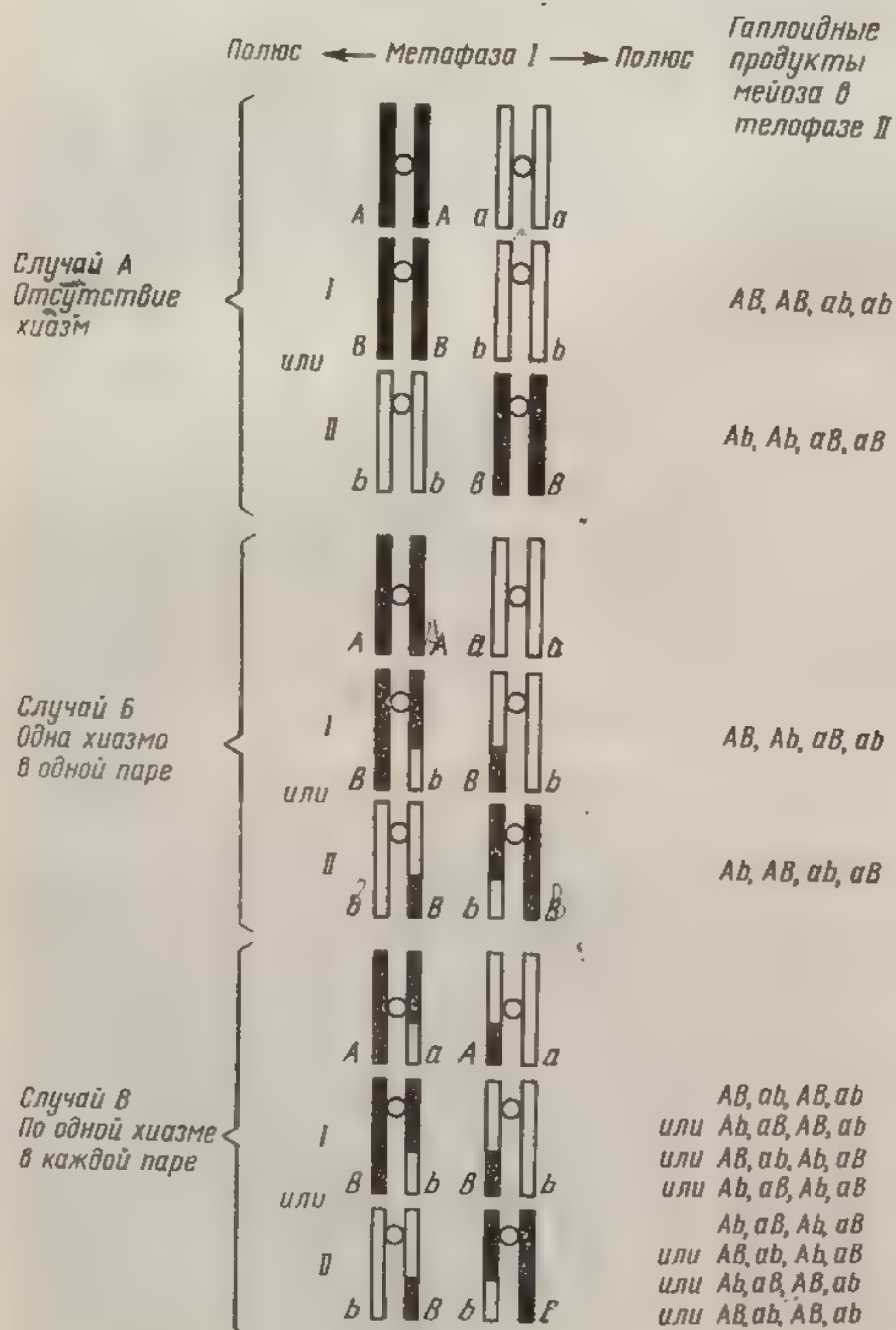


РИС. 4-6.

Поведение при мейозе генных пар, расположенных на негомологичных парах хромосом. Заметим, что, если рассмотреть все альтернативы в случае *В* и *В*II, получим $AB=ab=Ab=aB$

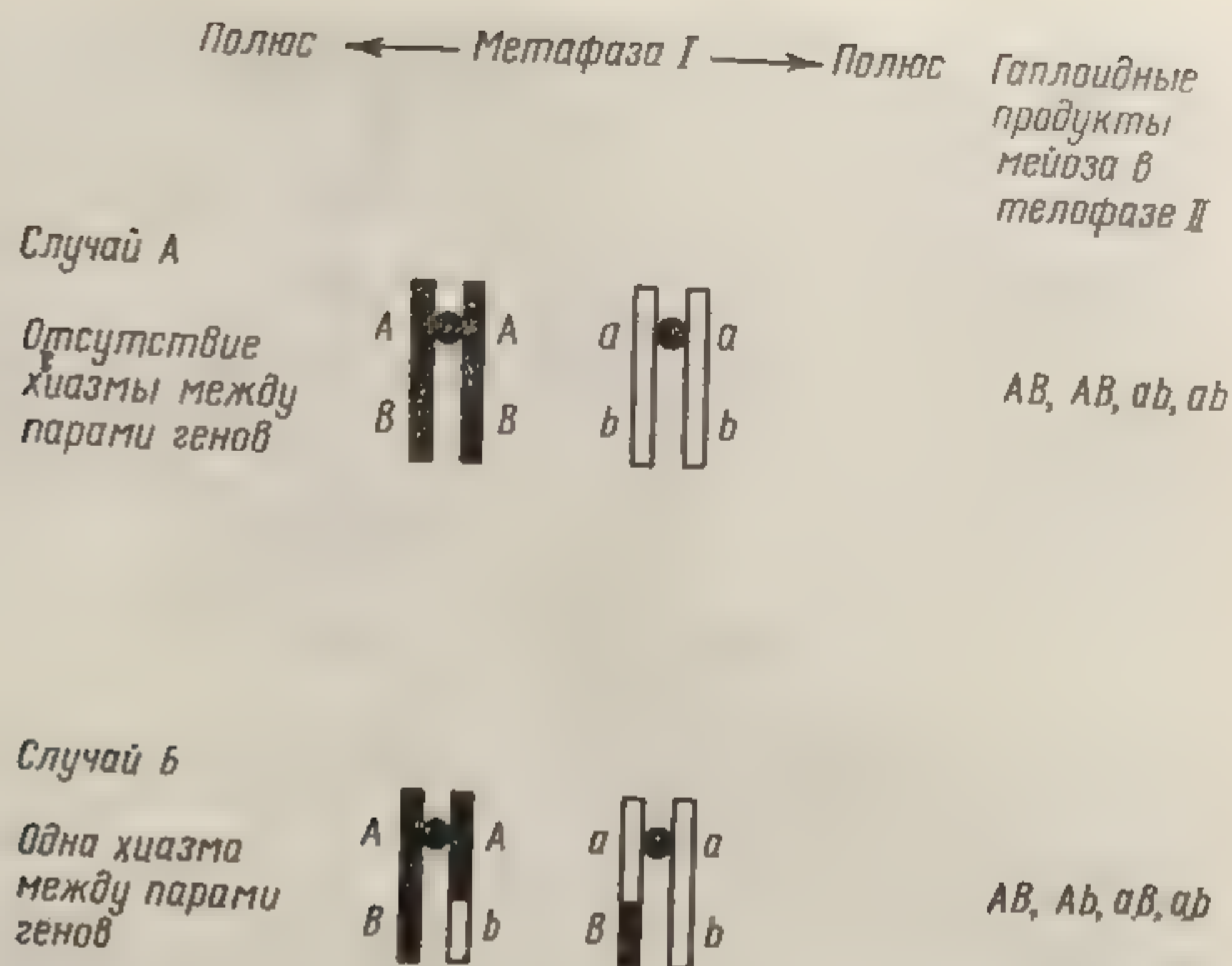


Рис. 4-7.

Поведение при мейозе пар генов, расположенных на одной паре хромосом

положению, находятся на одной хромосоме. Поэтому мы пока не будем считаться с тем, что неаллельные гены, расположенные на одной паре хромосом, могут давать старые и новые комбинации с одинаковой частотой, то-есть будем предполагать, что две пары независимо расщепляющихся генов располагаются в разных парах хромосом. На садовом горохе были получены данные, которые по крайней мере не противоречат этому предположению. Путем скрещивания гибридов по двум или большему числу генов удалось установить существование семи различных пар генов (в каждой из которых проявляется доминирование в гибридном состоянии), расщепляющихся независимо друг от друга. У садового гороха имеется диплоидный набор из семи пар хромосом; следовательно, их достаточно, чтобы каждая пара генов могла расположиться на отдельной паре хромосом.

ДРУГИЕ СООТНОШЕНИЯ ФЕНОТИПОВ¹

В моногибриде может проявляться действие лишь одного аллеля, может частично проявляться действие обоих аллелей и, наконец, оба аллеля могут проявлять себя полностью. Эти случаи были названы соответственно полным доминированием, частичным доминированием и отсутствием доминирования. В обсуждавшихся ранее опытах на садовом горохе полное доминирование приводит при скрещивании двух идентичных моногибридов к соотношению фенотипов 3 : 1. Поэтому потребовалось дополнительно скрещивать потомство с доминирующим фенотипом для того, чтобы установить наличие отношения генотипов 1 : 2 : 1, которое должно было быть в таком скрещивании. Если бы доминирование отсутствовало, то соотношение фенотипов было бы таким же, как соотношение генотипов. Тем не менее, во всех случаях рекомбинирования гены сохраняли свою индивидуальность и наблюдаемые характерные соотношения зависели только от отношений доминирования в данной генной паре, т. е. от характера проявления одного аллеля пары в присутствии другого.

¹ См. Батсон (W. Bateson, 1909).

| $AA' \times AA'$ | $BB \times BB'$ | $AA' BB \times AA' BB' \times 1/4$ |
|--------------------|--------------------|------------------------------------|
| $\frac{1}{4} AA$ | $\frac{1}{4} BB$ | 1 $AA BB$ (1) |
| $\frac{1}{4} AA$ | $\frac{1}{4} BB'$ | 2 $AA BB'$ (2) |
| $\frac{1}{4} AA$ | $\frac{1}{4} B'B'$ | 1 $AA B'B'$ (3) |
| $\frac{1}{4} AA'$ | $\frac{1}{4} BB$ | 2 $AA' BB$ (4) |
| $\frac{1}{4} AA'$ | $\frac{1}{4} BB'$ | 4 $AA' BB'$ (5) |
| $\frac{1}{4} AA'$ | $\frac{1}{4} B'B'$ | 2 $AA' B'B'$ (6) |
| $\frac{1}{4} A'A'$ | $\frac{1}{4} BB$ | 1 $A'A' BB$ (7) |
| $\frac{1}{4} A'A'$ | $\frac{1}{4} BB'$ | 2 $A'A' BB'$ (8) |
| $\frac{1}{4} A'A'$ | $\frac{1}{4} B'B'$ | 1 $A'A' B'B'$ (9) |

РИС. 4-6.

Генотипические частоты рекомбинаций

Полное доминирование не влияет также ни на ген, как таковой, ни на расщепление неаллельных пар генов. Выше уже были указаны ожидаемые соотношения генотипов при скрещивании двух конкретных дигибридов (рис. 4—4). Выведем тем не менее эти соотношения заново, пользуясь более общими обозначениями генов, с помощью несколько видоизмененного метода расходящихся диаграмм. Пусть A и A' обозначают одну пару аллелей, а B и B' — другую. Скрещивание $AA'BB' \times AA'BB'$ даст соотношение генотипов, изображенное на рис. 4—8.

Заметим, что среди каждых 16 потомков в среднем будет 9 разных генотипов в соотношении 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1. Как же это соотношение генотипов приводит к соотношению фенотипов 9 : 3 : 3 : 1, наблюдаемому в скрещиваниях конкретных дигибридов садового гороха? Здесь играют роль два фактора. Во-первых, в каждой паре аллелей проявляется доминирование, в результате чего соотношение генотипов 1 : 2 : 1 в каждой паре аллелей сводится к соотношению фенотипов 3 : 1. Во-вторых, действие двух пар генов не зависит друг от друга и каждая из них не оказывает заметного влияния на признак, определяемый другой парой. Поэтому оказывается возможным видеть оба соотношения 3 : 1 по отдельности даже в том случае, когда они случайным образом распределены в потомстве (рис. 4—5). Таким образом, становится очевидным, что те конкретные соотношения фенотипов, которые получаются при скрещиваниях по нескольким генным парам, зависят как от отношений доминирования между аллелями, так и от взаимодействия неаллельных генов.

Если в обеих парах генов нет доминирования и обе они действуют независимо друг от друга на разные признаки, получается два соотношения фенотипов 1 : 2 : 1, которые, распределяясь случайным образом, дадут соотношение фенотипов 1 : 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 1 : 2 : 1. Поскольку в этом случае ни один генотип не маскируется фенотипически другим, соотношения генотипов и фенотипов оказываются одинаковыми. (Это справедливо и для следующих скрещиваний: $AA'BB' \times AABV$, $AA'BB' \times A'A'B'B'$, $AA'BB \times AABV'$.) Такой результат получается в потомстве родителей, которые страдают малой талассемией (Tt) и обладают группой крови MN (MM') (MM дает фенотип M, $M'M'$ дает фенотип N, подробнее см. стр. 65).



РИС. 4-9.

Мутат J_{11} от J_{11} на J_{11} с за. реченной кр...

Если же в одной паре генов имеется доминирование, то два разных генотипа будут давать одинаковый фенотип, так что следует ожидать появления меньшего, чем 9, числа фенотипов. Так, если B доминирует над B' , то генотипы 1 и 2 (рис. 4—8) проявляются как один фенотип, генотипы 4 и 5 — как другой, а 7 и 8 — как третий, так что соотношение фенотипов становится $3 : 1 : 6 : 2 : 3 : 1$. Такое соотношение фенотипов следует ожидать в потомстве родителей, которые оба гетерозиготны по альбинизму (Aa) и обладают группой крови MN (MM'). Когда же доминирование имеется в обеих парах генов, генотипы 1, 2, 4, 5 дают один фенотип, генотипы 3 и 6 — другой, генотипы 7 и 8 — третий и генотип 9 — четвертый фенотип, в результате чего получается уже знакомое нам соотношение $9 : 3 : 3 : 1$. Доминирование приводит к уменьшению числа фенотипов.

Каких соотношений фенотипов можно ожидать, когда две разные пары генов, действующие независимо, влияют на один и тот же признак в одном направлении? Если некоторые комбинации аллелей в одной паре генов приводят к такому же фенотипу, что и определенные комбинации аллелей другой пары, то количество разных фенотипов окажется меньше максимального (в случае скрещивания 2 идентичных дигибридов меньше 9). Кроме того, количество разных фенотипов уменьшится еще заметнее, если отсутствие доминирования в обеих парах генов сменится доминированием в одной паре генов, и еще больше, если доминирование будет проявляться в обеих парах генов. Так, если A и B образуют равное количество пигмента меланина в коже человека, а A' и B' не производят его совсем, то, поскольку здесь нет доминирования и полное количество пигмента определяется просто суммарным действием рассматриваемых генов, скрещивание двух идентичных дигибридов дает вместо 9 разных фенотипов следующее соотношение 1 («черный», тип 1) : 4 («темный», типы 2, 4) : 6 («смуглый», типы 3, 5, 7) : 4 («светлый», типы 6, 8) : 1 («белый», тип 9). Более того, если и A и B полностью доминируют над своими аллелями, например оба дают полную окраску цветка, то соотношение фенотипов сведется к 15 (окрашенные, типы 1—8) : 1 (белый, тип 9). Заметим, что когда разные пары генов действуют на один и тот же признак в одном направлении, т. е. действие их имеет общую фенотипическую основу,



РИС. 4-9.

Мутант *Drosophila melanogaster*, у которого отсутствуют крылья (слева) и мутант с закрученными крыльями (curled wing)

их эффекты как бы *накладываются* друг на друга и действие одной пары генов влияет на обнаружение действия другой пары.

Иногда разные пары генов действуют независимо друг от друга на один и тот же признак по-разному, причем это действие может носить как антагонистический, так и кооперативный характер. Например, у дрозофилы (рис. 4—9) A' представляет собой рецессивный аллель, который превращает крылья в культю (рудиментарные крылья), тогда как B' — рецессивный аллель, вызывающий скручивание крыльев. Доминантный аллель A дает крылья нормальной длины, а доминантный аллель B — прямые крылья. Скрещивание двух идентичных дигибридов не дает привычного соотношения $9 : 3 : 3 : 1$. В данном случае получается соотношение 9 (прямые длинные крылья) : 3 (длинные закрученные крылья) : 4 (рудиментарные крылья, у четверти из них крылья были бы закручены, если бы они достигли нормальной длины). Таким образом, в этом случае фенотипическое проявление одной пары генов не позволяет обнаружить фенотипическое проявление другой пары генов.

В другом случае любая из двух пар генов может помешать проявлению определенного фенотипа. Пусть доминантные аллели A и B независимо друг от друга производят некие вещества, необходимые для образования красного пигмента. Рecessивные аллели этих генов A' и B' не способны образовывать этих веществ. В этом случае скрещивание двух идентичных дигибридов даст соотношение 9 (красные) : 7 (не красные, среди которых имеются 3 гомозиготы по A' , 3 гомозиготы по B' и 1 гомозигота и по A' и по B' одновременно). Заметьте, что, рассматривая рецессивные аллели, мы имели дело, соответственно, с примерами одностороннего и взаимного противодействия фенотипическому проявлению, но если рассматривать доминантные аллели, то эти же примеры иллюстрируют одностороннюю и взаимную кооперацию.

Во всех случаях, когда две пары генов влияют на один и тот же признак, взаимодействуя путем наложения, антагонизма или кооперации, одна пара генов влияет на возможность обнаружения эффекта другой пары. В этих случаях можно применить общий термин *эпистаз* для описания птерференции, заключающийся в подавлении или маскировке фенотипического проявления одной пары генов за счет участников других пар генов. Про гены, обнаружению которых мешают неаллельные гены, говорят, что они *гипостатичны*, или проявляют *гипостаз*. Подобно тому, как существование доминантности подразумевает рецессивность, так и эпистаз подразумевает *гипостаз*. Доминантность гена по отношению к своему аллелю и способность быть эпистатичным по отношению к неаллельным генам не обязательно связаны между собой. Так теоретически эпистатическое действие может зависеть от присутствия A или A' или AA' ; более того, гипостатическая реакция может проявляться в присутствии B или B' или BB' . Учитывая это, следует заметить, что в скрещиваниях идентичных дигибридов явление эпистаза — гипостаза может привести к появлению также и других, не описанных нами соотношений фенотипов.

Рассмотрим еще один пример дигибридного скрещивания, в котором в обеих парах генов проявляется доминантность, но отсутствует эпистаз. У дрозофилы обнаружено, что красный цвет глаз встречающихся в природе мух обусловлен одновременным наличием коричневого и красного пигментов. Пусть A — аллель, образующий красный пигмент, а A' — его рецессивный аллель, не образующий этот пигмент; B — это неаллельный предыдущему ген, образующий коричневый пигмент, а его рецессивный аллель, не образующий пигмента, B' . Скрещивание двух мух-дигибридов с красными глазами (полученных в скрещивании гомозиготных мух с красными $AAB'B'$ и коричневыми $A'A'BB$ глазами) дает в потомстве соотношение 9 (красные, содержащие $A - B -$) : 3 (красные, содер-

жащие $A - B'B' : 3$ (коричневые, содержащие $A'A'B -$) : 1 (белые, содержащие $A'A'B'B'$). Последний фенотип, возникший в результате отсутствия обоих пигментов, определяющих окраску глаз, оказывается совершенно новым для этой серии скрещиваний. Этот случай свидетельствует о том, что взаимодействие неаллельных генов может привести к появлению совершенно новых фенотипов. Такие взаимодействия изменяют не соотношение фенотипов, а их характер.

Все это говорит о том, что каждый данный фенотипический признак может быть результатом взаимодействия нескольких пар генов. Более того, мы приходим к заключению, что полный фенотип — это продукт действия всего генотипа, а также внешней среды. Разница между соотношениями генотипов и фенотипов часто обусловлена характером проявления как аллельных, так и неаллельных генов, действие которых взаимно накладывается, проявляет комплементарность или антагонизм на физиологическом или биохимическом уровне. Кроме того, в некоторых случаях возможно прямое влияние одного гена на способность функционирования другого аллельного или неаллельного гена. Частично природу взаимодействия генов можно понять на основании характерного изменения соотношения фенотипов. Однако для понимания тонких механизмов взаимодействия необходимо знать, как действуют гены и какова природа и судьба продуктов, ими образуемых. Ни один из случаев, когда соотношение фенотипов отклоняется от ожидаемого соотношения генотипов, не опровергает факта независимого расщепления. Действительно, независимое расщепление генов было впервые доказано, несмотря на вводящее в заблуждение фенотипическое упрощение соотношения генотипов, обусловленное явлением доминантности. Более того, принцип независимого расщепления можно было бы показать даже на основании скрещиваний, в которых проявляется эпистаз или появляются совершенно новые фенотипы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При независимом изучении двух разных признаков было установлено, что существование фенотипически альтернативных форм объясняется наличием в каждом случае одной пары генов. Затем было исследовано распределение фенотипов в последовательных поколениях, причем эти признаки одновременно прослеживались у одних и тех же особей. Полученные данные показали, что каждый признак обусловлен присутствием особой пары генов; отсюда следует, что генетический материал построен не из одной неделимой пары генов, а из многих расщепляющихся пар генов. Более того, результаты экспериментов лучше всего объясняются на основании принципа, согласно которому расщепление одной пары аллелей происходит независимо от расщепления всех остальных проверенных пар аллелей. Простейшая гипотеза относительно физической природы независимого расщепления неаллельных генов состоит в том, что различные пары генов располагаются в негомологичных парах хромосом.

Фенотипическое проявление генов зависит от их аллелей, если имеется доминирование, и от неаллелей, если имеется эпистаз (как при наложении, так и при кооперации и антагонизме). Возможно также появление совершенно новых фенотипов. При отсутствии доминирования и эпистаза соотношение фенотипов прямо отражает соотношение генотипов. Наличие доминирования или эпистаза приводит к уменьшению числа различных фенотипов. В любом случае на свойства генов как таковых, на расщепление и независимое расщепление, характер взаимодействия генов в фенотипическом проявлении не оказывает никакого влияния.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

4.1. Постройте генетические диаграммы для скрещиваний и потомства, о которых речь идет во втором и третьем абзаце на стр. 49. Проверьте правильность обозначений.

4.2. Используется ли анализирующее или обратное скрещивание для определения генотипов на основании фенотипов в тех случаях, когда нет доминантности? Поясните.

4.3. Какие типы гамет и с какими частотами образуют особи генотипов а, б, в и г, если все пары генов расщепляются независимо друг от друга?

а. $Aa BbCC$

в. $AaBbCc$

б. $AABbCcDD$

г. $MmNnOoPp$

4.4. Сколько разных диплоидных генотипов может возникнуть в потомстве, когда у обоих родителей происходит независимое расщепление 1, 2, 3, 4, n пар гетерозиготных генов?

4.5. Что можно сказать о родителях, если среди их потомства наблюдаются следующие соотношения фенотипов:

а. 3:1;

в. 9:3:3:1;

б. 1:1;

г. 1:1:1:1?

4.6. Законно ли утверждение, что пара хромосом может содержать только одну пару генов? Поясните.

4.7. Допустим, что определенное растение садового гороха представляет собой септагибрид. Какая часть гамет у этого растения будет содержать все семь рецессивных неаллельных генов? Все семь доминантных неаллельных генов? И доминантные и рецессивные гены?

4.8. Какая часть потомков скрещиваний а, б, в и г будет полностью гомозиготна, если все гены расщепляются независимо друг от друга?

а. $Aa Bb \times AaBb$

в. $AaBBcc \times AABbcc$

б. $AABbCC \times AAbbcc$

г. $AA' \times A''A''$

4.9. Почему выдвигается предположение, согласно которому вслед за независимым расщеплением происходит случайное оплодотворение гамет независимо от их генотипа?

4.10. В чем заключается специфическая природа генетического материала?

4.11. Повлияло ли открытие независимого расщепления генов на наши представления о размере генов? Поясните.

4.12. Какое значение мы вкладываем в данный момент в термин «генетическая рекомбинация»?

4.13. Какие факторы могут изменить ожидаемое соотношение фенотипов?

4.14. У львиного зева красная окраска цветков (R) частично доминирует над белой окраской (r), так что у гибридов цветки розовые. Узкие листья (N) частично доминируют над широкими листьями (n), так что у гибридов листья обладают промежуточной шириной («средние»). Какие соотношения генотипов и фенотипов должны получиться в потомстве, если допустить, что рассматриваемые пары генов расщепляются независимо друг от друга:

а. растение с красными цветками и средними листьями скрещивается с растением с розовыми цветками и средними листьями?



УИЛЬЯМ БЭТСОН
(1861—1926)

б. растение с розовыми цветками и средними листьями скрещивается с растением с белыми цветками и узкими листьями?

в. скрещиваются два идентичных дигибрида?

4.15. Ребенок-альбинос страдает малой талассемией. Каковы наиболее вероятные генотипы его родителей?

4.16. Как можно объяснить, что определенный тип облысения, обусловленный одной парой генов, доминантен у мужчин и рецессивен у женщин?

4.17. У голубоглазых супругов обычно рождаются только голубоглазые дети. Голубоглазые дети могут родиться также у кареглазых супругов. Введите обозначение генов так, чтобы можно было записать полные генотипы всех лиц в перечисленных ниже семьях:

а) у одного из двух мальчиков-близнецов были карие глаза, а у другого — голубые;

б) голубоглазый ребенок с шерстистыми волосами по одному из этих признаков похож на отца, а по другому — на мать;

в) кареглазый ребенок, не страдающий талассемией, похож по этим признакам на бабушку, но отличается от матери.

4.18. В чем разница между доминантностью и эпистазом?

4.19. Какое максимальное количество разных генотипов можно получить в потомстве от скрещивания двух моногибридов?

4.20. При скрещивании двух зеленых растений кукурузы получается потомство, в котором примерно $\frac{9}{16}$ растений имеет зеленый цвет, а $\frac{7}{16}$ не окрашены. Как можно объяснить этот результат?

4.21. Можно ли утверждать, что взаимодействие генов имеет место только в том случае, когда происходит скрещивание двух идентичных моногибридов или дигибридов? Поясните.

4.22. Производится скрещивание кур чистой линии с розовидными гребнями с курами чистой линии с гороховидными гребнями (см. рис. 4—10). У всех F_1 оказываются ореховидные гребни. При скрещивании двух F_1 с ореховидными гребнями получается F_2 с соотношением 9 (ореховидные) : 3 (розовидные) : 3 (гороховидные) : 1 (простой). Введите генетические обозначения, с помощью которых можно объяснить полученные результаты.

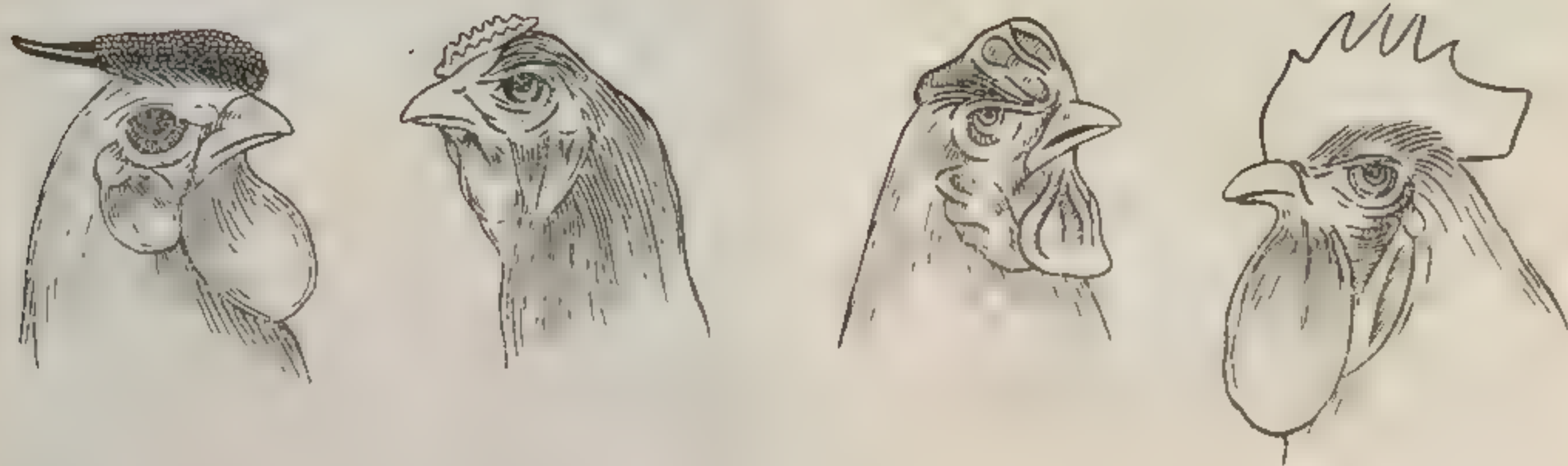


РИС. 4-10.

Различные виды гребня (слева направо): розовидный, гороховидный, ореховидный, простой

4.23. Трех петухов с ореховидными гребнями скрестили с курами с простыми гребнями. В одном случае все потомство имело ореховидные гребни. В другом случае у одного потомка был простой гребень. В третьем случае у части потомства были ореховидные гребни, а у части — гороховидные. Каковы генотипы родителей и всех вышеупомянутых потомков?

4.24. Скрещивание особей с ореховидным гребнем с особями с розовидными гребнями дало в F_1 4 потомков с простыми гребнями, 5 — с гороховидными, 13 — с розовидными и 12 — с ореховидными. Каковы наиболее вероятные генотипы родителей?

4.25. Скрещивание двух особей с ореховидными гребнями дало в F_1 следующее соотношение фенотипов по форме гребня: 1 ореховидный, 1 розовидный, 1 простой. Каковы генотипы родителей?

4.26. Безроговость или комолость рогатого скота обусловлена полностью доминантным геном P . Особи, обладающие нормальными рогами, представляют собой pp . Ген рыжей масти (R) не доминирует над геном белой масти (R'), так что у гибридов (RR') получается чалая масть. Какие генотипические и фенотипические соотношения должны получиться в потомстве скрещиваний, если эти две пары генов расщепляются независимо друг от друга:

а. $PpRR \times ppRR'$

б. $PpRR' \times ppR'R'$

в. $PpRR' \times PpRR'$

г. (комолая, чалая, мать которой была рогатой) \times (рогатый белый).

4.27. При скрещивании чистой линии собак коричневой масти с собаками из чистой белой линии все многочисленное F_1 потомство оказалось белой масти. Среди потомства большого числа скрещиваний белых F_1 между собой оказалось 118 белых, 32 черных и 10 коричневых. Как можно генетически объяснить эти результаты?

4.28. Для ответа на вопрос этой задачи воспользуйтесь ответом на предыдущую. Какие соотношения генотипов и фенотипов можно ожидать в потомстве следующих скрещиваний:

а. черной (один из родителей которой был коричневым) с коричневой?

б. черной (один из родителей которой был коричневым, а другой черным) с белой (один родитель был коричневым, а другой из чистой линии белых).

4.29. При скрещивании чистопородных белых леггорнов с чистопородными белыми шелковистыми курами все потомство оказывается белым. В F_2 , однако, среди большого количества потомков наблюдается соотношение примерно 13 (белые) : 3 (цветные). Введите соответствующие обозначения и дайте генетическое объяснение этому результату.

4.30а. У...
пурный...
его с растен...
цветков...
ные): 13...
4.305. П...
который при скр...
также давал пот...
шлвании этих F_1 ...
: 68 (желтые). Д...
4.30в. Как мо...
мутантов с желтым...
центрами?
4.31. Дайте го...
перечисленным н...
а. У глухих су...
б. У глухих су...
в. У нормальн...
обладали нормаль...
г. У нормальн...
д. Двое здоров...
также здоровым...
было 9 здоровых...
4.32. Чем можн...
хлопка с коричнев...
волокно у F_1 , а пр...
которое содержит в...
зеленых и очень м...
4.33. В брак вст...
родилось восемь де...
можно объяснить та...
4.34. На каких о...
могут проявиться д...
4.35. При скрещи...
го потомства подобн...
потомства отличае...
похожи друг на друг...
4.36. Можно ли о...
одновременно имеютс...
глаз и альбинизма?
4.37. Допустим, ч...
в основном двумя па...
черная кожа и весс...
темную кожу, любые...
типы следующих род...
а. оба смуглые и...
б. оба черные и...
в. оба смуглые, а...
г. один смуглый, а...
д. 1/3 светлых, 1/3...
ЛИ Г Г Р А Т У Р А
W. Bateson, Mendel's Principles
G. Mendel. См. литературу

4.30а. У желтых маргариток центр цветка обычно окрашен в пурпурный цвет. Был открыт мутант с желтым центром; при скрещивании его с растениями с пурпурным центром цветка в потомстве F_1 у всех цветков центр пурпурный. В F_2 получается соотношение 47 (пурпурные) : 13 (желтые). Дайте генетическое объяснение этому результату.

4.30б. Позднее был обнаружен другой мутант с желтым центром, который при скрещивании с маргаритками с пурпурным центром цветка также давал потомство только с пурпурным центром. Однако при скрещивании этих F_1 между собой получалось соотношение 97 (пурпурные) : 68 (желтые). Дайте генетическое объяснение этому результату.

4.30в. Как можно объяснить, что скрещивание двух описанных выше мутантов с желтым центром цветка дает потомство только с пурпурными центрами?

4.31. Дайте генетическое объяснение, которое приложимо ко всем перечисленным ниже случаям наследования у человека:

а. У глухих супругов все дети обладали нормальным слухом.

б. У глухих супругов все дети также были глухими.

в. У нормальных супругов было много детей. Примерно $3/4$ из них обладали нормальным слухом, а $1/4$ были глухими.

г. У нормальных супругов все дети обладали нормальным слухом.

д. Двое здоровых идентичных близнецов вступили в брак с двумя также здоровыми идентичными близнецами. Всего в этих двух семьях было 9 здоровых и 9 глухих детей.

4.32. Чем можно объяснить тот факт, что при скрещивании растений хлопка с коричневым и зеленым цветом волокна получается зеленое волокно у F_1 , а при скрещивании этих F_1 между собой получается F_2 , которое содержит в основном коричневые волокна, некоторое количество зеленых и очень немного белых.

4.33. В брак вступили два альбиноса, не состоящие в родстве. У них родилось восемь детей — четыре альбиноса и четыре неальбиноса. Как можно объяснить такое соотношение?

4.34. На каких стадиях жизненного цикла нейроспоры и кукурузы могут проявляться доминантность и эпистаз?

4.35. При скрещивании двух растений было обнаружено, что $63/64$ всего потомства подобно либо одному, либо другому родителю, а $1/64$ часть потомства отличается от обоих родителей. Все растения второго типа похожи друг на друга. Каково генетическое объяснение этого результата?

4.36. Можно ли ожидать наличия эпистаза у человека в браках, где одновременно имеются признаки: шерстистых волос и облысения? карих глаз и альбинизма? облысения и карих глаз?

4.37. Допустим, что у человека различия в цвете кожи обусловлены в основном двумя парами независимо расщепляющихся генов: *BBCC* — черная кожа и *bbcc* — белая кожа. Любые три аллеля черной кожи дают темную кожу, любые два — смуглую и один — светлую. Каковы генотипы следующих родителей:

а. оба смуглые и имеют одного черного и одного белого ребенка?

б. оба черные и имеют ребенка-альбиноса?

в. оба смуглые, все дети тоже смуглые?

г. один смуглый, а другой светлый; из большого числа детей $3/8$ смуглых, $3/8$ светлых, $1/8$ темных, $1/8$ белых?

ЛИТЕРАТУРА

W. Bateson. Mendel's Principles of Heredity. Cambridge, 1909.

G. Mendel. См. литературу к главе 3 и Приложение I (в конце книги).

Глава 5

МНОЖЕСТВЕННЫЕ АЛЛЕЛИ; МУЛЬТИГЕННЫЕ ПРИЗНАКИ

Все рассмотренные в предыдущих главах результаты расщепления по фенотипу удастся объяснить, признавая разделение генетического материала на пары генов. Поскольку не было приведено еще доказательств того, что ген может встречаться более чем в двух различных состояниях, то можно утверждать, что единственной альтернативной формой данного гена (например, гладких семян) является отсутствие этого гена (что дает, соответственно, морщинистые семена). Такой взгляд на *альтернативные состояния гена* можно назвать *гипотезой присутствия — отсутствия*. Для того чтобы доказать, что не все мутации приводят к потере целого гена и что гены могут мутировать в альтернативные формы, очевидно, необходимо найти ген, у которого бы имелось больше двух альтернатив. Если, как мы ранее предположили, гены образуются только в результате репликации генов, то существование *множественных аллелей* представляется весьма вероятным, поскольку каждый организм содержит большое число неаллельных генов, многие из которых в процессе эволюции должны были образоваться из общего прародительского гена.

МНОЖЕСТВЕННЫЕ АЛЛЕЛИ

1. *Группы крови у человека*. Множество исследований семей по группам крови дают нам сведения о числе возможных альтернативных форм аллеля. Однако прежде чем перейти к обсуждению этих работ, нам следует кратко познакомиться с тем, что понимается под *группой крови*.

В плазме крови человека имеются красные кровяные тельца, эритроциты. На поверхности этих клеток расположены вещества, именуемые *антигенами*, тогда как в плазме содержатся или могут появляться вещества, называемые *антителами*. Антитела представляют собой весьма специфический тип молекул, способных реагировать и связывать специфический антиген. Эту реакцию можно наглядно представить в виде замка (антитела), в который вставляется соответствующий ключ (антиген). Если ввести кролику подходящий антигенный материал, например, чужеродные красные кровяные тельца, ранее в его кровь никогда не попадавшие, то определенные клетки, ответственные за образование антител, образуют их в столь большом количестве, что эти антитела появляются в плазме крови. Часть их вступит в специфическую реакцию с антигенными компонентами чужеродных кровяных телец. Если через некоторое время в кровяное русло кролика снова ввести те же антигены, то в крови уже будут присутствовать специфические антитела, способные связывать эти антигены. Образование комплекса между антителом и антигеном часто приводит к слипанию (агглютинации) красных кровяных телец. Легко разработать методику, с помощью которой эту реакцию можно наблюдать в пробирке или на стеклянной пластинке.

Итак, кроликам инъецируют эритроциты разных людей и у них образуются антитела против соответствующих антигенов. Кровь таких кроликов, освобожденная от клеток центрифугированием, может служить *антисывороткой*: она содержит антитела, вызывающие слипание любых добавленных к ней эритроцитов, если они содержат исходные типы анти-

генов. К. Ландштейнер и П. Левине обнаружили, что у кроликов в таких опытах образуется два резко отличающихся типа антисывороток и что кровь любого человека, проверенная с помощью этих двух антисывороток, дает с ними одну из трех возможных реакций: агглютинация эритроцитов происходит либо только в одной из двух антисывороток (названной произвольно анти- M), либо только в другой (анти- N), либо в обеих антисыворотках. Соответственно кровь любого человека по характеру антигенов их эритроцитов можно отнести к одной из трех групп: M , N или MN .

Результаты изучения групп крови системы MN родителей и их детей суммированы в табл. 5—1. Родители шестого типа дают потомство, у которого группы крови встречаются в соотношении $1 : 2 : 1$ для $M : MN : N$. Следовательно, эти группы крови обусловлены действием одной пары генов. Если мы обозначим через M ген для антигена группы крови M , а через M' — соответствующий аллельный ген, образующий антиген группы N , то пользуясь генетическими обозначениями, скрещивание 6 следует записать в виде $MM' \times MM'$, а потомство $1MM : 2MM' : 1M'M'$. Обратим внимание на то, что ни один из этих аллелей не доминирует над другим: люди с генотипом MM' имеют и M и N -антигены. Результаты по всем остальным семьям также согласуются с вышеприведенным генетическим объяснением наличия групп крови системы MN .

Таблица 5—1

MN ГРУППЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В РАЗНЫХ СЕМЬЯХ

| Родители | Дети | | |
|-------------------|-------|-------|-------|
| | M | MN | N |
| 1. $M \times M$ | все | — | — |
| 2. $N \times N$ | — | — | все |
| 3. $M \times N$ | — | все | — |
| 4. $MN \times N$ | — | $1/2$ | $1/2$ |
| 5. $MN \times M$ | $1/2$ | $1/2$ | — |
| 6. $MN \times MN$ | $1/4$ | $1/2$ | $1/4$ |

Для изучения других групп крови нужно приготовить другие антисыворотки. Одна из таких сывороток определяет наличие или отсутствие так называемого резус, или Rh -фактора. Кроликам инъецируют красные кровяные тельца обезьян резус. Вторая инъекция резус-крови, произведенная через некоторый промежуток времени, приводит к ее агглютинации. Это объясняется наличием в эритроцитах обезьян резус антигена, против которого у кролика уже образовались антитела, раньше чем была сделана вторая инъекция. Этот антиген называется Rh , а индуцированные антитела называются анти- Rh .

Если кролику, у которого в сыворотке имеются анти- Rh антитела, ввести человеческую кровь, то оказывается, что кровь 85% людей агглютинирует. Эти люди имеют так называемую резус положительную (Rh -положительную) группу крови, тогда как у 15% кровь не агглютинирует и относится к резус отрицательной (Rh -отрицательной) группе. Соответственно у 85% людей имеется тот же Rh -антиген, что и у обезьян резус, тогда как у 15% его нет. Сочетание семейного и родословного анализа показывает, что присутствие Rh антигена у людей контролируется доминантным геном, который обозначается как R , а отсутствие — рецессивным аллелем. Как было впервые показано К. Ландштейнером, можно получить еще две другие антисыворотки, названные анти- A и анти- B . Оказалось, что у людей с помощью этих антисывороток обнаруживается четыре типа крови: кровь первого типа агглютинирует под действием анти- A (группа крови A), второго — агглютинирует в анти- B (группа крови B),

третьего — агглютинирует в обеих сыворотках (группа AB) и, наконец, четвертого не агглютинирует ни в одной из них (группа O).

Семейный анализ групп крови системы ABO дает результаты, приведенные в табл. 5—2. Заметим, что в браках $A \times O$, а также $B \times O$ получается два разных типа потомства. В каждом случае один тип потомства (браки 9 и 11) можно объяснить, предположив, что родитель, не принадлежавший к группе O , гетерозиготен и ген O у него рецессивен. Пусть i будет ген, ответственный за O группу крови, а I^A аллельным геном A группы, причем последний доминантен. Тогда браки типа 9 записываются в виде $I^A i \times ii$, браки 10 — в виде $I^A I^A \times ii$, а браки типа 13 — $ii \times ii$. Для объяснения состава потомства в браках 11 и 12 нам необходимо предположить, что существует ген I^B для группы крови B , который также доминирует над i и с которым он расщепляется. Тогда брак 11 представляет собой $I^B i \times ii$, а брак 12 — $I^B I^B \times ii$. Обратите внимание: мы делаем здесь дополнительное допущение. В первом случае альтернативной аллельной формой гена i служит I^A , в то время как во втором — I^B . Это значит, что I^A и I^B также являются аллелями. Результаты, полученные при изучении браков типа 7 и 8, подтверждают это предположение. В гетерозиготе $I^A I^B$ нет доминирования: кровь людей с таким генотипом относится к группе AB . Таким образом, все результаты, приведенные в таблице, удалось объяснить генетически. Отметим, что I^A и I^B обладают качественно отличным антигенным действием. Таким образом, мы показали, что ген может находиться в любом из двух или из большего числа альтернативных состояний, т. е. у гена могут быть множественные, различные аллели. Разумеется, каждая особь в норме имеет не больше двух из всех возможных множественных аллелей.

Таблица 5—2

ABO ГРУППЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В РАЗНЫХ СЕМЬЯХ

| | Родители | Дети | | | |
|-----|----------------|-------|-------|-------|-------|
| | | A | AB | B | O |
| 7 | $AB \times AB$ | $1/4$ | $1/2$ | $1/4$ | — |
| 8 | $AB \times O$ | $1/2$ | — | $1/2$ | — |
| 9* | $A \times O$ | $1/2$ | — | — | $1/2$ |
| 10* | $A \times O$ | все | — | — | — |
| 11* | $B \times O$ | — | — | $1/2$ | $1/2$ |
| 12* | $B \times O$ | — | — | все | — |
| 13 | $O \times O$ | — | — | — | все |

* В некоторых семьях.

2. *Изоаллели групп крови.* Было показано, что людей с кровью группы A можно подразделить на три разные подгруппы, которые определяются слегка отличающимися аллельными формами гена I^A — I^{A1} , I^{A2} , I^{A3} . Три слегка отличающихся альтернативных состояния известны и для гена I^B , что обуславливает наличие трех подгрупп и в группе крови B . Таким образом, аллели, которые вначале кажутся идентичными, могут оказаться различными при дальнейшем изучении. Такие аллели называют *изоаллелями*. Удастся обнаружить и другие примеры изоаллелизма, поскольку разные аллели не совсем одинаково реагируют на присутствие неаллельных генов, на такие изменения во внешних условиях, как изменение температуры, влажности, а также на воздействие агентов, модифицирующих темп мутаций. Очевидно, число обнаруженных изоаллелей зависит от того, сколько фенотипических критериев применяется для сравнения аллелей и насколько малы те фенотипические отличия, которые еще удастся различить.

В случае групп крови системы АВО иногда бывает достаточно подразделять людей на основании аллелей, дающих антиген А-типа, В-типа или не дающих никакого антигена. Следовательно при этом достаточно рассматривать только три аллеля. Однако для детального изучения генетических закономерностей часто приходится иметь дело со всеми аллелями.

3. *Изоаллели у дрозофилы.* В разных популяциях дрозофилы дикого типа, которые мы обозначим 1, 2 и 3, на крыльях имеется полный и одинаковый набор жилок. У гибридов, полученных в результате всех возможных скрещиваний между этими популяциями, характер жилкования не меняется. Это говорит о том, что все три популяции генотипически идентичны по рассматриваемому признаку. С другой стороны, имеется мутантная линия с неполным жилкованием: у гомозиготных мух кубитальная жилка имеет перерыв ($ci = cubitus interruptus$) (рис. 5-1). У гибридов, полученных при скрещивании мух $ci\ ci$ с мухами дикого типа из популяций 1 и 2, крылья имеют полное жилкование, т. е. ген нормального жилкования ci^+ в этих популяциях полностью доминирует над ci . Однако у гибридов $ci^{+3} ci$, полученных при скрещивании мух $ci\ ci$ с дикими мухами из популяции 3, имеется разрыв кубитальной жилки. Более того, можно показать, что отсутствие доминирования ci^{+3} над ci обусловлено взаимодействием именно этой пары генов, а не модифицирующим действием другой пары. Отсюда очевидно, что ci^+ аллель в популяции 3 отличается от соответствующего аллеля в популяциях 1 и 2. Таким образом, здесь мы встречаемся с двумя изоаллелями из серии множественных аллелей. (Обратите внимание на тот факт, что здесь мы пользовались системой генетических обозначений, несколько отличающейся от используемой ранее).

4. *Цвет глаз дрозофилы.* Другая серия множественных аллелей у дрозофилы определяет цвет глаз. В этом случае разные аллели можно расположить в ряд по степени влияния на цвет глаз, который меняется от красного до белого: красный (w^+), кровавый (w^{bl}), коралловый (w^{co}), абрикосовый (w^a), рыжий или цвета буйволовой кожи (w^{bl}) и белый w . Аллель w^+ доминирует над всеми остальными перечисленными аллелями и именно он чаще всего встречается у мух дикого типа. Можно считать, что разные аллели дают один и тот же фенотипический эффект, непрерывно ослабевающий по мере продвижения от w^+ к w , причем аллель w совершенно не дает эффекта.

Мы описали изоаллели генов, которые обычно проявляют себя в диких особях, обитающих в природе (изоаллели дикого типа). Известны также изоаллели мутантных генов (мутантные изоаллели). Например, было доказано, что ген w белых глаз дрозофилы на самом деле в разных линиях образует серию множественных изоаллелей (w^1 , w^2 , w^3 и т. д.).

5. *Самостерильность табака (Nicotiana).* Растения, размножающиеся половым путем, довольно часто неспособны к самоопылению, хотя у них на одной и той же особи в одно и то же время образуются и мужские, и женские гаметы. Причина этого явления была изучена на растениях табака. Было обнаружено, что пыльцевое зерно, попадая на рыльце пестика своего же растения, не может прорасти через столбик, и в результате этого самооплодотворение оказывается невозможным.

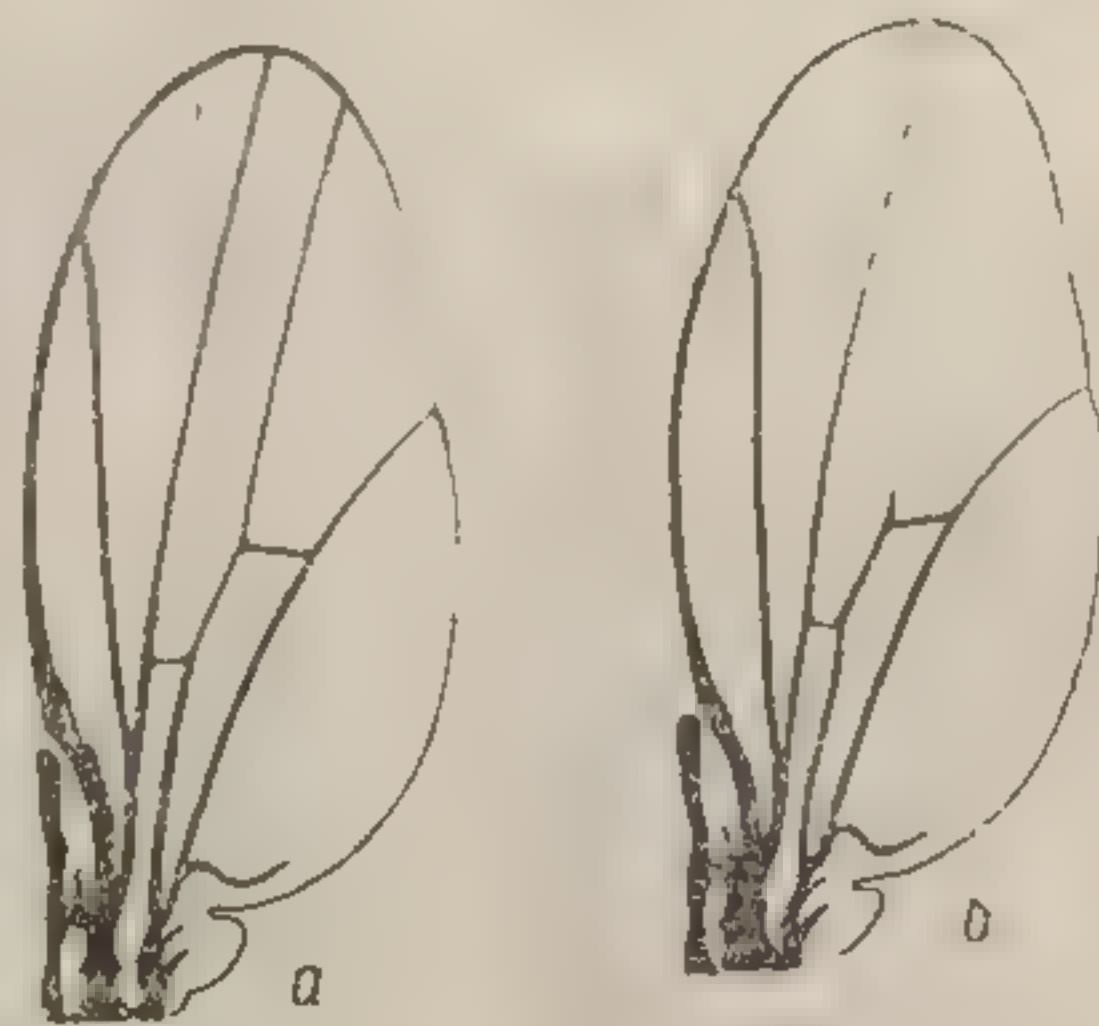


рис. 5-1.

Нормальное крыло (а) и крыло с разрывом кубитальной жилки (б) у *Drosophila melanogaster*

Ключ к пониманию этого явления дает следующее наблюдение: оказалось, что пыльца полностью самостерильного растения может прорасти на других растениях, причем на разных растениях прорастает различный процент пыльцевых зерен.

Результаты некоторых скрещиваний приведены на рис. 5-2. На генетически идентичные пестики была нанесена пыльца того же растения (А), второго растения (Б) и третьего (В). В случае А не проросло ни одно пыльцевое зерно, в случае Б проросла примерно половина и в случае В — почти все зерна. Заметим, что в случае Б, хотя вся пыльца была получена от одного диплоидного растения, половина ее пыльцевых зерен смогла, а половина не смогла прорасти на данном хозяине.

Вспомним, что рыльце и столбик построены из диплоидной ткани, а пыльца гаплоидна. Отсюда следует, что способность пыльцы к прорастанию зависит не от диплоидного генотипа родителя, а от гаплоидного генотипа самой пыльцы.

Допустим, что самостерильность и перекрестная стерильность определяется одной парой генов. Назовем s^3 аллель, содержащийся в пыльце и дающий ей возможность прорасти в случае Б. Пыльца растения хозяина, пестики которого использовались в этих опытах, не может содержать s^3 , так как иначе пыльца могла бы прорасти на своем родителе, тогда как она не может этого сделать (случай А). Таким образом, ткань пестика в данном случае не может содержать s^3 ; один из аллелей, содержащихся в этой ткани, можно назвать s^1 . Следовательно, половина пыльцевых зерен растения хозяина будет содержать s^1 (случай А), но поскольку они не способны к прорастанию, мы должны предположить, что любое пыльцевое зерно не сможет прорасти, если оно несет тот же s аллель, который имеется в пестике. Если исключить возможность возникновения мутации, то s^1 не может быть вторым аллелем в пестике хозяина, так как в противном случае при образовании этого растения одно пыльцевое зерно s^1 должно было бы прорасти через материнский столбик, в котором в качестве одного из двух аллелей был s^1 , что по нашей гипотезе невозможно. Поскольку в пестике, о котором идет речь, второй аллель не может быть ни s^1 , ни s^3 , назовем его s^2 . Таким образом, вторая половина пыльцевых зерен в случае А содержит s^2 и поэтому также не может прорасти. В отношении случая Б самое простое предположение заключается в том, что неспособные к прорастанию пыльцевые зерна несут либо s^1 , либо s^2 , но какой именно из этих двух аллелей, — нельзя установить без дополнительных исследований. Поскольку в случае В прорастают все

зерна, то один из аллелей пыльцы должен быть новым, назовем его s^4 , другим может быть либо s^3 , либо еще какой-нибудь новый аллель s^5 . Для решения вопроса о том, какой это аллель, также нужны дополнительные опыты.

В рассмотренном примере фенотипическими альтернативами были способность или неспособность пыльцы к прорастанию. При нанесении пыльцы любого растения на любой пестик, если только одновременно имеют место обе альтернативы, соотношение фенотипов всегда составляет 1 : 1. Все эти результаты, а также ряд других находятся в соответствии с высказанным выше предположением,

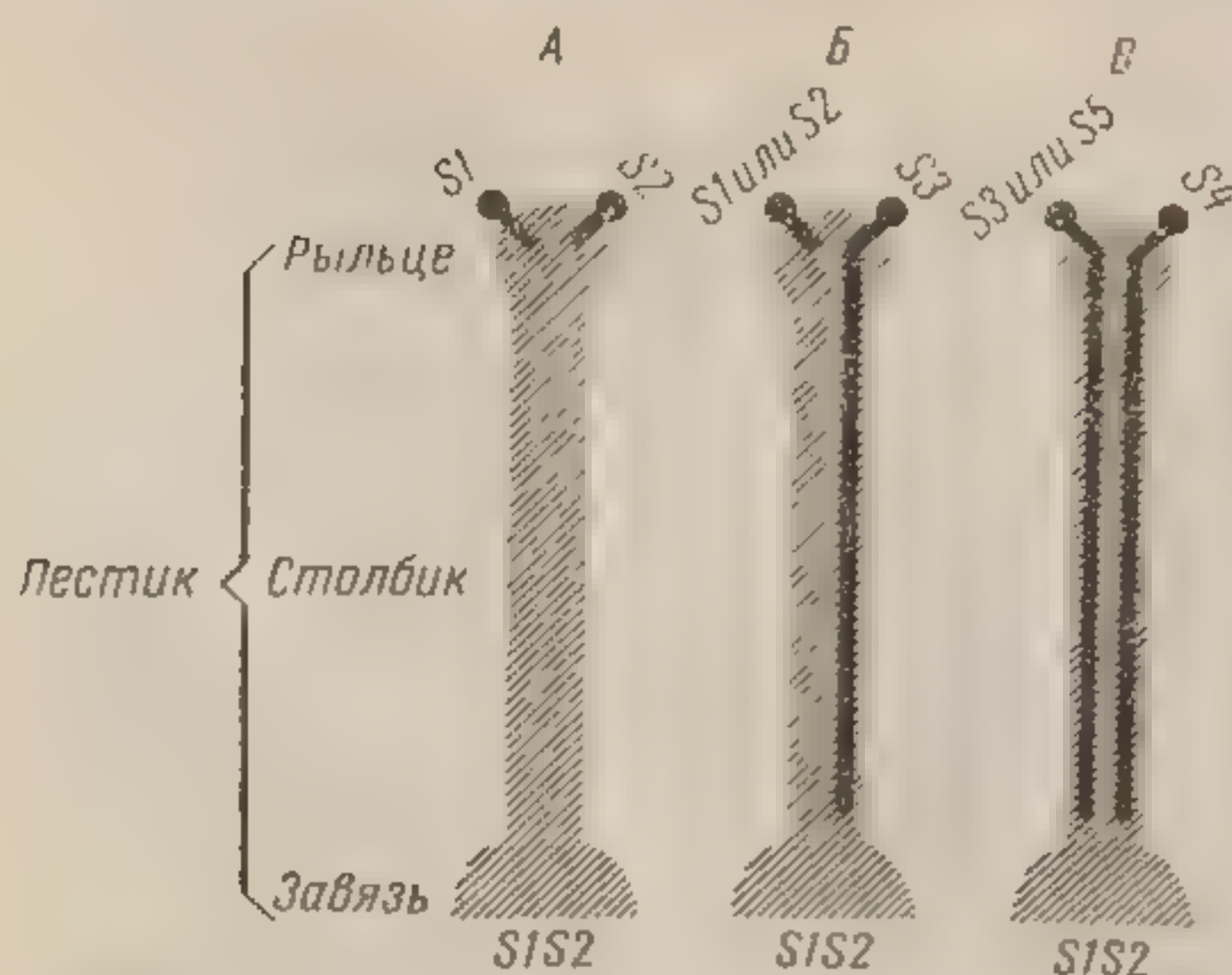


РИС. 5-2.

Множественные аллели, определяющие перекрестную стерильность и самостерильность

согласно которому самостерильность и перекрестная стерильность определяются одной парой генов, образующих серию множественных аллелей. Некоторые виды имеют пятьдесят и больше множественных аллелей, образующих серию, ответственную за самостерильность, групповую стерильность или групповую несовместимость.

МУЛЬТИГЕННЫЕ ПРИЗНАКИ

До сих пор для изучения генов мы пользовались такими признаками, которые встречаются в виде ясно очерченных, качественно отличающихся альтернатив, например, окраска цветка у садового гороха, альбинизм, противостоящий нормальной пигментации, или группы крови у человека. Это *дискретные*, или *качественные*, признаки, поскольку каждая особь четко относится к какому-либо одному фенотипу. Для его появления в конечном счете может быть необходимо действие многих, если не всех генов, однако конкретные фенотипические альтернативы, рассмотренные ранее, зависят в основном только от одной или нескольких пар генов. Более того, в этих случаях внешние, негенетические условия, если и оказывают, то только слабое влияние на наблюдаемые фенотипические различия.

Из практических и теоретических соображений важно также знать генетическую природу *непрерывных признаков*, таких как высота растений кукурузы или умственные способности человека, т. е. признаков, для которых имеется столь много градаций, что разделить все особи на четко различающиеся классы не представляется возможным. Такие признаки часто называют *количественными*, поскольку по ним наблюдается непрерывный ряд фенотипов, и для того, чтобы охарактеризовать данную особь, эти признаки нужно определенным образом измерить. Находятся ли количественные признаки под контролем генов? Сделаем простейшее допущение, а именно, что *количественные признаки отличаются от качественных только тем, что первые обусловлены суммарным действием большого числа пар генов*. В случае *мультигенных* (полигенных) признаков в результате действия многих генных пар может иметь место большое число фенотипических классов, и эффект каждой отдельной пары генов выяснить трудно.

Поскольку каждая пара генов оказывает незначительное влияние на проявление данного количественного признака, то следует ожидать, что влияние условий среды может оказаться относительно больше действия любого из этих генов или пар генов, взятых поодиночке. В качестве примеров действия среды на мультигенные признаки можно указать на зависимость размера колоса от удобрений и на влияние характера питания на рост людей.

Некоторые признаки могут с одной стороны определяться качественно, а с другой — количественно. Так, у садового гороха одна пара генов «решает», будет ли данное растение нормальным или карликовым, тогда как точный размер нормального растения зависит от взаимодействия большого числа генов, в котором немалую роль играют условия среды. Аналогично одна пара генов может определять, каким из двух альтернативных признаков будет обладать данный человек: сильной умственной отсталостью или нормальными умственными способностями. Однако у нормальных людей имеется много градаций умственных способностей, постепенно переходящих друг в друга и подверженных влиянию как среды, так и множества генов.

Если количественные признаки определяются многими генами, то можно определить другие их свойства, согласующиеся с экспериментальными наблюдениями, рассмотрев сначала такой признак как качественный (т. е. определяемый одной, двумя, или тремя парами генов), а затем как

количественный (определяемый многими парами генов). Пусть таким признаком будет окраска, а альтернативными цветами в P_1 будут черный и белый. Предположим, что в нашем случае нет доминирования и эпистаза (см. стр. 58). Тогда независимо от того, сколько (1, 2, 3 или множество) генов определяет окраску, все F_1 будут обладать одинаковым промежуточным фенотипом, т. е. будут окрашены в серый цвет. Рассмотрим теперь для разных случаев результаты скрещиваний между F_1 (либо путем перекрестного оплодотворения, либо путем самооплодотворения) (рис. 5-3). С увеличением числа пар генов, участвующих в определении признака, число разных типов потомков F_2 возрастает. Когда число классов становится достаточно большим, можно ожидать, что под влиянием внешних условий некоторые особи «выпадут» из своего класса и окажутся либо между классами, либо в соседнем фенотипическом классе. Таким образом, с увеличением числа пар генов фенотипические классы становятся более

многочисленными и перестают быть дискретными, что приводит к непрерывной градации фенотипов.

Заметим еще, что по мере увеличения числа пар генов, определяющих данный признак, доля F_2 , похожих на любого из родителей P_1 , уменьшается. Так, при одной паре генов $1/2$ F_2 будет либо белого, либо черного цвета, при двух парах генов — $1/8$, при трех парах — $1/32$ и так далее. В результате этого по мере увеличения числа генов от десяти до двадцати и более непрерывное распределение фенотипических классов в F_2 образует постепенно сужающуюся кривую распределения. Иными словами, вероятность обнаружения в F_2 фенотипа, в определенной степени отличающегося от среднего, уменьшается при увеличении числа генов, определяющих данный признак. Если можно сравнительно легко установить одна, две или три пары генов определяют данный признак, то гораздо труднее это сделать в тех случаях, когда их число превышает три. В случае большого числа генов приблизительное представление о их числе дает измерение степени изменчивости фенотипа в популяции относительно среднего фенотипа. Вариабельность признака можно определить методами статистики следующим образом. Находится *среднее значение m* (среднее арифметическое). Затем определяют *квадратичное отклонение χ* (меру отклонения от среднего), определяя разницу между результатами каждого измерения и средним значением. Эту разницу для каждого измерения возводят в квадрат и суммируют все полученные таким образом величины, после чего сумму делят на число, на единицу меньшее числа измерений.

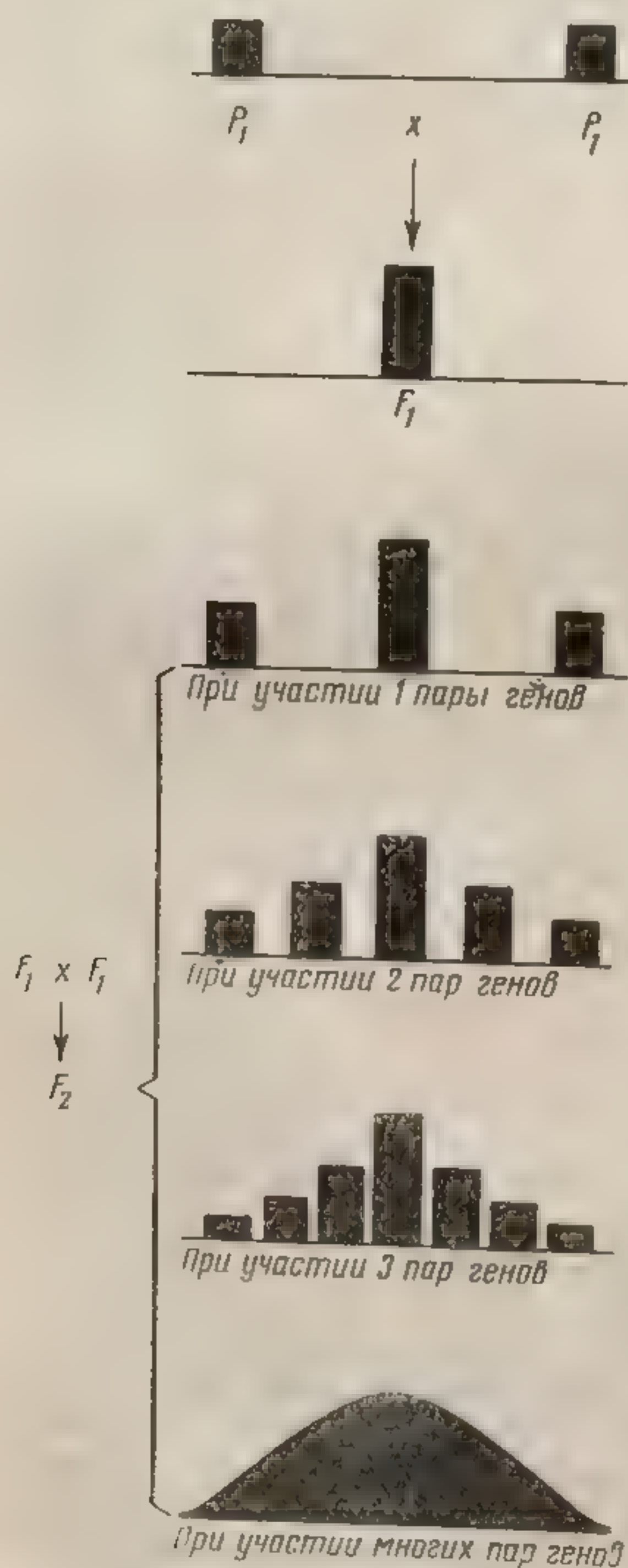


РИС. 5-3.

Зависимость числа фенотипических классов от числа пар генов. По горизонтали отложены классы, по вертикали — относительные частоты

При заданном числе изученных особей и прочих равных условиях, чем больше будет квадратичное отклонение, тем меньше число генов, определяющих данный признак, что и следовало ожидать на основании рис. 5—3. С подробностями статистических методов определения квадратичного отклонения можно познакомиться в любом элементарном учебнике по математической статистике.

Рассмотрим теперь влияние доминантности на выражение количественных признаков. Когда качественный признак определяется одной, двумя или тремя парами генов без доминирования, то имеется соответственно три, пять или семь возможных фенотипических классов (см. рис. 5—3). Однако при наличии доминантности число этих классов уменьшается (ср. глава 4, стр. 57).

Поскольку число генных пар, определяющих данный признак, пропорционально числу фенотипических классов, то установление этого числа для количественного признака при наличии доминирования даст заниженные цифры. Это обстоятельство очень существенно, так как у многих генов проявляется полная или частичная доминантность.

Пусть в гипотетическом случае две пары генов при условии доминирования будут давать такой же фенотипический эффект, что и одна пара без доминирования.

Допустим, что ген A (как в паре AA , так и в паре Aa) вносит вклад в фенотипический эффект, измеряемый двумя условными единицами, тогда как его рецессивный аллель a (в сочетании aa) — лишь одной единицей. Допустим далее, что B (в виде BB или Bb) уменьшает эффект на одну единицу, а его рецессивный аллель b (в виде bb) вообще не оказывает никакого влияния. Тогда при скрещивании особи, имеющей две единицы ($AAbb$), с особью с нулем единиц эффекта ($aaBB$) в F_1 получится однородное промежуточное потомство, обладающее одной единицей ($AaBb$) эффекта. Состав F_2 , полученного при скрещивании F_1 , можно определить, пользуясь методом расходящихся диаграмм (рис. 5—4). Соотношение фенотипов в F_2 $3 : 10 : 3$ практически очень трудно отличить от соотношения фенотипов $1 : 2 : 1$, получаемого при скрещивании двух моногибридов в отсутствие доминирования (Т. Н. Edwards, 1960).

Доминирование оказывает и другой эффект на характер наследования количественных признаков, который можно проиллюстрировать с помощью двух скрещиваний с участием только что рассмотренных пар генов. В первом между собой скрещиваются особи, имеющие ноль единиц эффекта: $aaBb \times aaBb$. В потомстве получается $\frac{3}{4} aaBb$ (0 единиц) и $\frac{1}{4} aabb$ (1 единица). В этом случае родители, обладающие крайним фенотипом (0 единиц), дали потомство, которое в среднем имеет менее крайний фенотип (0,25 единицы). Во втором скрещивании $Aabb \times Aabb$ фенотип родителей представлял собой другую крайность (2 единицы эффекта). В потомстве получается $\frac{3}{4} Abb$ (2 единицы) и $\frac{1}{4} aabb$ (1 единица), т. е. в среднем фенотип потомства менее крайний (1,75 единицы по сравнению с 2). Этот результат является типичным случаем влияния доминирования, именуемого *регрессией*. Вследствие регрессии особи, фенотип которых отличается от среднего в любую сторону, дают потомство с фенотипом, менее отличающимся от среднего значения.

Рис. 5—5 иллюстрирует принцип регрессии для полигенных признаков. Если бы не было домини-

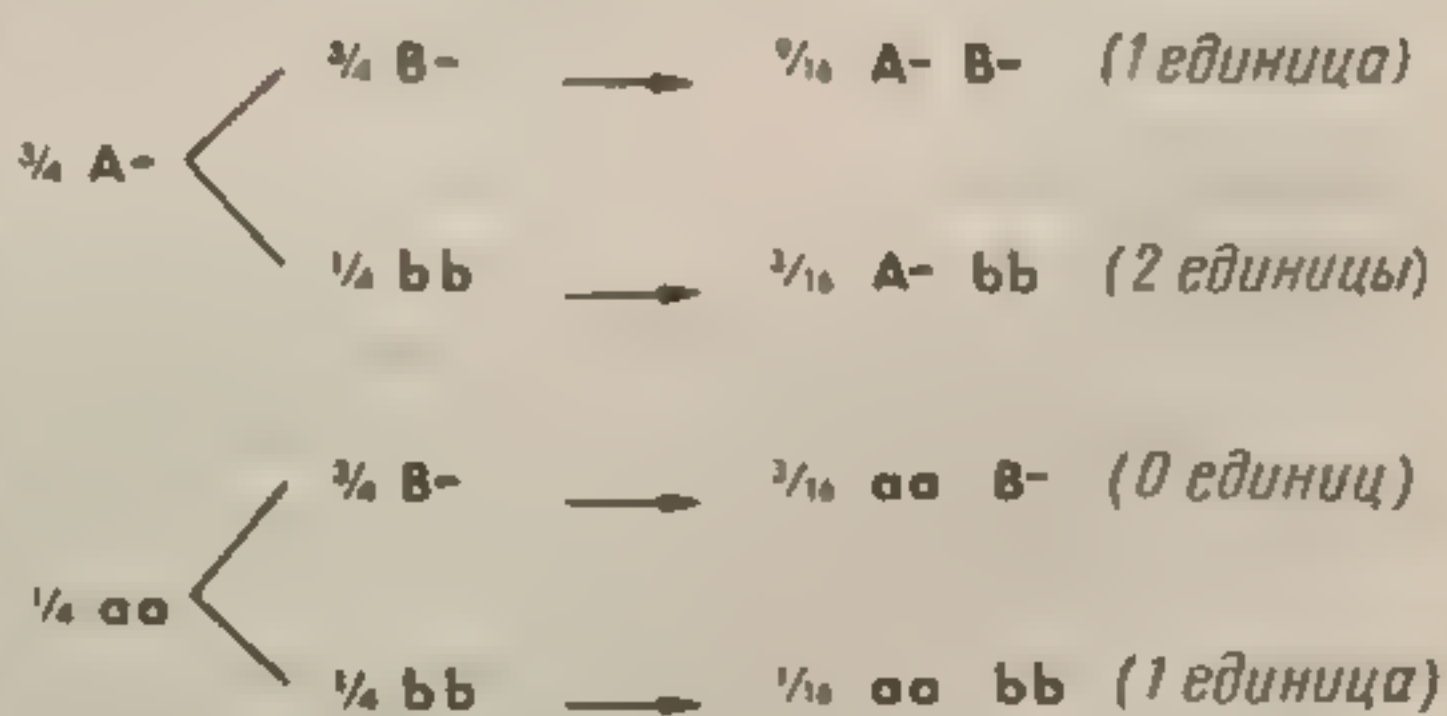


рис. 5-4.

Результаты скрещивания дигибридов, описанных в тексте

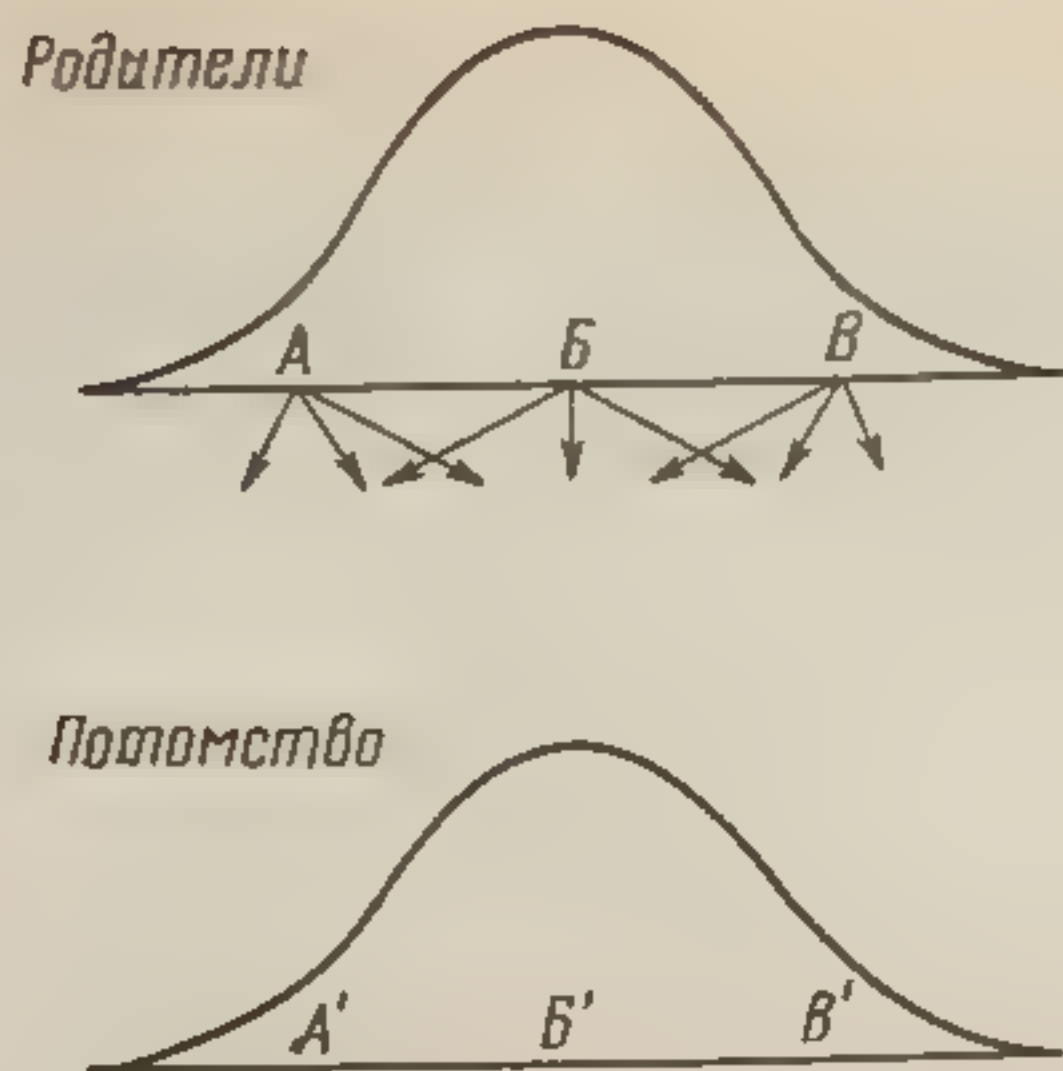


РИС. 5-5.
Принцип регрессии

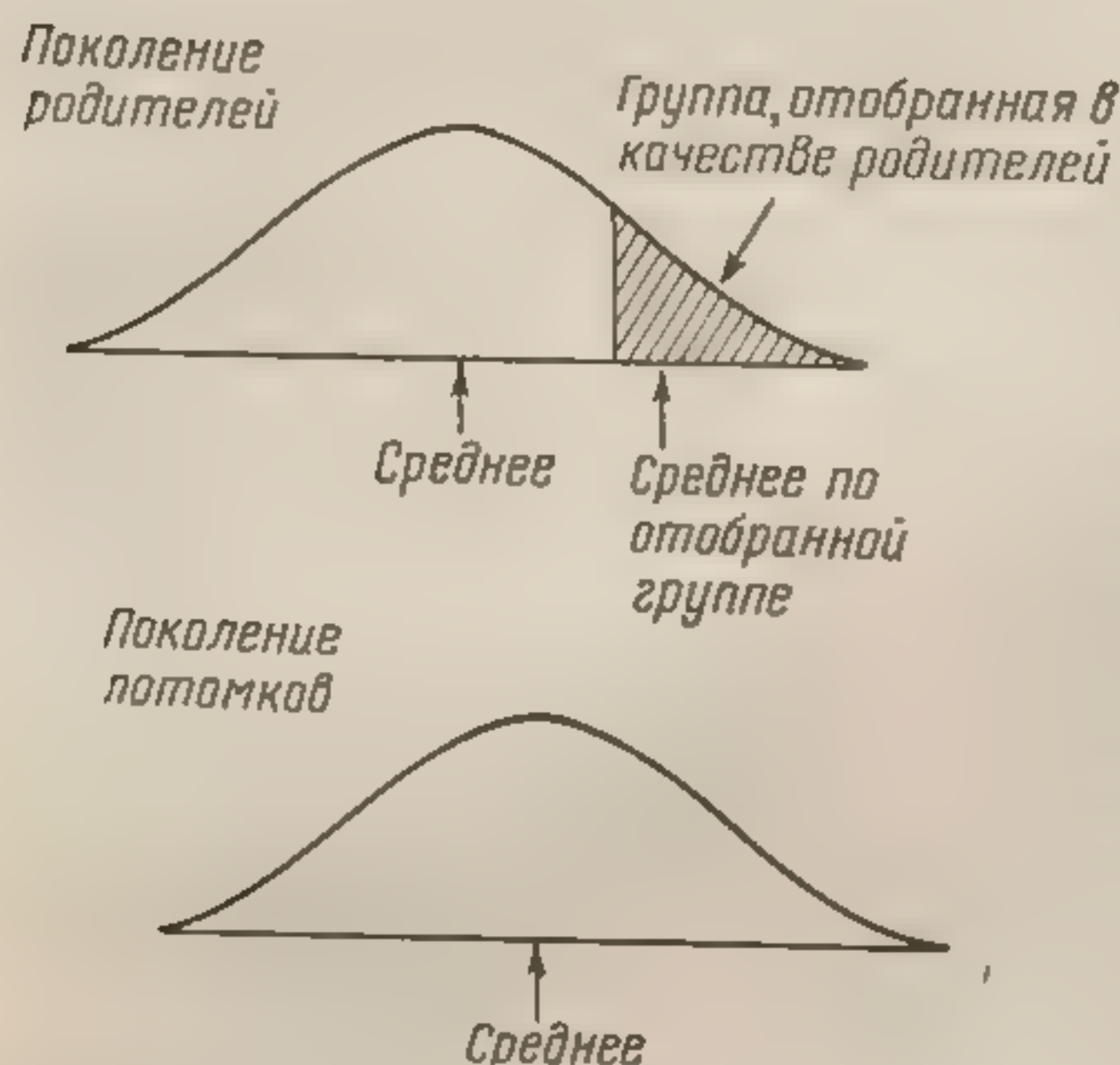


РИС. 5-6.
Отбор по количественному признаку

кой-то мере доминирование проявляется, будет иметь место регрессия, и фенотип особей первого поколения будет в среднем несколько менее крайним, чем фенотип родителей, но несколько более крайним, чем исходный средний фенотип. Если продолжать отбирать соответствующие особи в течение нескольких поколений, то потомство в среднем будет все больше и больше приближаться к желаемому крайнему фенотипу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ген может существовать в любом из двух или из большего числа различных состояний. Такие генетические альтернативы образуют серии множественных аллелей (иногда изоаллелей).

Некоторые аллели данного гена могут приводить к появлению совершенно разных, качественно различающихся фенотипов (следовательно, в гибриде ни один из них не доминирует); другие аллели могут проявлять разные степени влияния на фенотипически количественный признак (в этом случае в гибриде возможно как наличие, так и отсутствие доминирования).

рования, то потомство родителей, находящихся в точках А, В и В, попало бы в среднем в соответствующие точки А', В' и В' кривой, описывающей потомство. (Воздействие внешних условий привело бы к определенным фенотипическим флуктуациям вокруг этих средних точек на кривой, характеризующей потомство). В случае же доминирования потомки А будут находиться в среднем правее А', что показано стрелками, тогда как потомки В' окажутся в среднем левее В. Присходящая при этом из поколения в поколение потеря особей с крайними фенотипами не сделает всю популяцию более фенотипически гомогенной, так как существует уравновешивающая тенденция к отклонению от среднего за счет той части популяции (В), которая дает потомство, отличающееся от родителей в обе стороны от среднего значения. В результате, как и при отсутствии доминирования, кривая распределения потомков будет такой же, как и в родительской популяции.

Для того чтобы получить линию особей, фенотип которых сильно отличается от среднего его выражения в популяции, надо взять в качестве родителей организмы с крайними значениями данного количественного признака (рис. 5—6). Если бы не было доминирования, то первое поколение потомков имело бы в среднем тот же фенотип, что и в отобранной группе родителей. Поскольку обычно в ка-

Гены определяют как непрерывные, так и дискретные признаки. Непрерывные признаки обычно определяются большим числом пар генов, каждая из которых проявляет малый фенотипический эффект, который часто ослабляется или усиливается под влиянием внешних условий.

Вариабельность количественного признака такова, что чем больше число гетерозиготных полигенов его определяет, тем уже кривая распределения и меньше шансов обнаружить в потомстве крайние фенотипы. В случае гетерозиготных полигенов доминирование приводит к уменьшению числа фенотипических классов и пропорционально увеличивает число потомков с крайними фенотипами, что обычно приводит к недооценке числа генов, определяющих данный количественный признак. Кроме того, доминирование приводит к регрессии; поэтому, чтобы получить линию с желаемым фенотипом, необходимо проводить селекцию в течение многих поколений.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

5.1. Обсудите наличие доминирования в случае групп крови человека.

5.2. Почему необходимо предполагать, что ген может существовать в более чем двух аллельных формах?

5.3. Кровь ребенка относится к группе АВ. Что можно сказать о генотипе родителей? Какую группу крови можно ожидать у будущих внуков?

5.4. Кровь одного из родителей относится к группе А, а другого — к группе В. Каковы генотипы этих родителей, если у них имеется много детей со следующими группами крови:

а. У всех АВ?

б. Половина АВ, половина В?

в. Половина АВ, половина А?

г. $\frac{1}{4}$ АВ, $\frac{1}{4}$ А, $\frac{1}{4}$ В, $\frac{1}{4}$ О?

5.5. Приведите примеры полной доминантности и ее отсутствия у людей.

5.6. Способствует ли существование полной доминантности выяснению генетической основы альтернативных состояний данного признака?

5.7. У отца с группой крови М и О имеется ребенок с MN и В-группами крови. Какой генотип может быть у матери?

5.8. Приведите доводы против утверждения: «Альтернативное состояние генов можно объяснить на основании гипотезы присутствия — отсутствия».

5.9. Женщина с группой крови В имеет ребенка с группой крови О. Каковы их генотипы и каким не может быть генотип отца, если не учитывать возможности возникновения мутации?

5.10. Как Вы относитесь к точке зрения, согласно которой все существующие различные гены можно считать разными состояниями одной основной единицы, способной сохранять свою целостность и самореплицироваться?

5.11. Сколько может быть различных генотипов, если имеется четыре разных аллеля одного гена?

5.12. Не подразумевается ли в тексте этой главы, что, во-первых, имеется бесконечное разнообразие изоаллелей и, во-вторых, что не существует даже двух идентичных генов? Поясните.

5.13. Как можно проверить, являются ли гены белой окраски глаз в двух разных популяциях дрозофилы аллелями, изоаллелями или неаллелями?

5.14. У кроликов перечисленные ниже аллели дают постепенный переход от полной пигментации до белой окраски меха: *агути* (*C*), *шиншилла* (*c^h*) и *альбинос* (*c*). Еще один аллель *c^h* дает гималайскую окраску. *C* полностью доминирует над всеми остальными аллелями, *c^h* полностью доминирует над *c*, тогда как *c^h* не доминирует ни над *c^h*, ни над *c*.

а. Сколько может быть разных диплоидных генотипов при участии перечисленных аллелей?

б. Светлый шиншилла, скрещенный с агути, дает потомство альбиносов. Каковы генотипы родителей и потомства?

в. При скрещивании агути со светлыми шиншилла в F_1 получился один кролик-агути и два кролика с гималайской окраской. Какие генотипы могут быть у родителей и детей?

г. При скрещивании кролика агути с кроликом шиншилла получилось потомство агути. Какие генотипы и фенотипы можно ожидать в потомстве, полученном от скрещивания F_1 -агути с кроликами-альбиносами?

5.15. Какой процент abortивных пыльцевых трубок и какие генотипы потомства будут наблюдаться в следующих скрещиваниях табака?

а. $s1s2 \times s1s3$ в. $s1s4 \times s1s4$
б. $s1s3 \times s2s4$ г. $s3s4 \times s2s3$

5.16. Можно ли доказать существование множественного аллелизма у организма, который размножается только бесполом путем?

5.17. Существует ли эпистаз среди генов, определяющих количественные признаки. Поясните.

5.18. Можно ли утверждать, что в случае количественных признаков внешние условия играют большую роль в определении фенотипа, чем в случае качественных признаков? Поясните.

5.19. При каких условиях три пары генов, определяющих количественный признак, могут дать только семь разных фенотипов?

5.20. Правильно ли, что в результате изучения полигенных признаков не было обнаружено новых генетических принципов?

5.21. Пусть каждый ген, обозначенный заглавной буквой, увеличивает высоту растения на один сантиметр. Растение $aabbccdde$ имеет высоту 12 см. Предположим, что в скрещивании $Aa Bb cc Dd Ee \times aabb CC Dd Ee$ происходит независимое расщепление всех пар генов.

а. Какова высота родителей?

б. Какова высота самого длинного растения в F_1 ?

в. Какова высота самого короткого растения в F_1 ?

г. Какова доля самых низких растений в F_1 ?

д. Имеется ли в системе доминирование или эпистаз? Поясните.

5.22. В каком случае легче отобрать чистую линию с желаемым фенотипом по количественному признаку: когда есть доминирование или когда его нет?

5.23. Измерьте 10 зерен фасоли с точностью до миллиметра. Вычислите квадратичное отклонение в этой выборке. С чем связана величина этого отклонения?

5.24. Есть ли какие-либо преимущества для организма в том, что данный признак определяется количественно, т. е. многими парами генов, а не качественно, т. е. в основном одной или немногим числом пар генов?

5.25. Как можно доказать, что мы имеем дело с множественными аллелями, а не множественными парами генов?

5.26. При скрещивании определенной породы рогатого скота пятнистой окраски с другой породой, имеющей равномерную окраску, получается потомство F_1 с равномерной окраской. В пятнистой породе имеет место большая изменчивость от особей, равномерно окрашенных, за исключением маленьких белых пятен, до белых с небольшими окрашенными пятнами. Отбор в этой породе позволяет увеличить или уменьшить окрашенную площадь. Какова генетическая основа окраски в этих двух породах рогатого скота?

5.27. У кукурузы одного сорта в початке имеется 16 рядов зерен, а у другого сорта 8 рядов. У F_1 , полученного при скрещивании этих сортов, наблюдается промежуточный фенотип, в среднем 12 рядов. F_2 фенотипически очень неоднородно, количество рядов варьирует от 8 до 18, причем примерно в одном из каждых 32 початков имеется столько же рядов зерен, что и у одного из P_1 . Сколько генов определяют данный признак?

5.28. Две линии кур отличаются по весу. Хотя F_1 , полученное при скрещивании этих линий, фенотипически весьма однородно и обладает промежуточным весом, примерно один из каждых 150 F_2 оказывается заметно тяжелее или, наоборот, легче любого из P_1 . Какое генетическое объяснение можно дать этим фактам?

ЛИТЕРАТУРА

J. F. Crow. Genetics Notes. 5th ed. Minneapolis, 1962.

J. H. Edwards. The simulation of Mendelism. — *Acta Genet.*, 1960, 10, 63—70.

D. S. Falconer. Introduction to quantitative genetics. N. Y., 1961.

R. R. Race а. *R. Sanger.* Blood Groups in Man. 4th ed Philadelphia, 1962.

A. S. Wiener а. *I. B. Wexler.* Heredity of the Blood Groups. N. Y., 1958.

Глава 6

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ

Мы уже обсуждали изменения соотношений фенотипов в результате взаимодействия аллельных и не аллельных генов (стр. 55—59). В данной главе рассматривается еще ряд других фенотипических проявлений действия гена. Начнем с обсуждения роли генов в жизнеспособности организмов, которая также модифицирует соотношение фенотипов.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

У львиного зева (*Antirrhinum*) встречается два типа растений, одни зеленого, другие бледно-зеленого цвета. При скрещивании зеленых растений между собой получается потомство только зеленого цвета. При скрещивании бледно-зеленых растений получают проростки, из которых 25% зеленого цвета (*AA*), 50% бледно-зеленого цвета (*Aa*) и 25% белого (*aa*). Последние после истощения запасов питательных веществ в семени погибают, так как у них отсутствует хлорофилл. Таким образом, среди взрослых растений наблюдается соотношение фенотипов 1 (зеленые): 2 (бледно-зеленые). Поскольку доминирование в этом случае отсутствует, среди проростков наблюдается соотношение фенотипов 1:2:1, характерное для моногибридного скрещивания. Это соотношение за счет гибели альбиносов превращается у взрослых растений в 2:1.

Скрещивание двух желтых мышей дает в потомстве F_1 соотношение 2 (желтые): 1 (нежелтая). Было показано, что в таких скрещиваниях $1/4$ оплодотворенных яйцеклеток не завершает своего развития, и на ранних стадиях эмбриогенеза происходит спонтанный аборт. Поскольку в результате скрещивания между собой нежелтых мышей получается только нежелтое потомство, очевидно, что этот фенотип определяется гомозиготной парой генов. Желтые мыши должны быть гетерозиготны, а особи, погибшие на ранних стадиях эмбрионального развития, гомозиготны, но отличны от желтых гомозигот. Обычно применяемые обозначения генов в этом случае явно неудовлетворительны, так как здесь мы должны описать два эффекта одного и того же гена: окраску и жизнеспособность. Более того, аллель, который доминирует в отношении одного эффекта, проявляет рецессивность в отношении другого, и наоборот. Эта трудность разрешается употреблением букв с индексами для обозначения каждого гена (табл. 6—1); буква обозначает один признак, а индекс — другой. Пусть

Таблица 6—1

РЕЗУЛЬТАТЫ СКРЕЩИВАНИЙ ЖЕЛТЫХ МЫШЕЙ

| | Желтые | × | Желтые |
|-------|--|-------------------------|---------------------------|
| P_1 | $Y^I y^L$ | | $Y^I y^L$ |
| q_1 | $1/2 Y^I, 1/2 y^L$ | | $1/2 Y^I, 1/2 y^L$ |
| F_1 | $\left[\begin{array}{c} 1/4 Y^I Y^I \\ \text{Погибают} \end{array} \right]$ | $1/2 Y^I y^L$ Желтые | $1/4 y^L y^L$ Нежелтые |

рис. 6-1.
Классификация
степени в шее
способность

индекс 1 об
по желтой
жизнеспособ
скрещивание
: 2 $Y^I y^L$ (же

Как в сл
из-за прису
гибель особ
или просто л
называют ре
гот — домини
мых ранних,
промежуточн
ном или одн
неаллельных
таются от обо
способные по

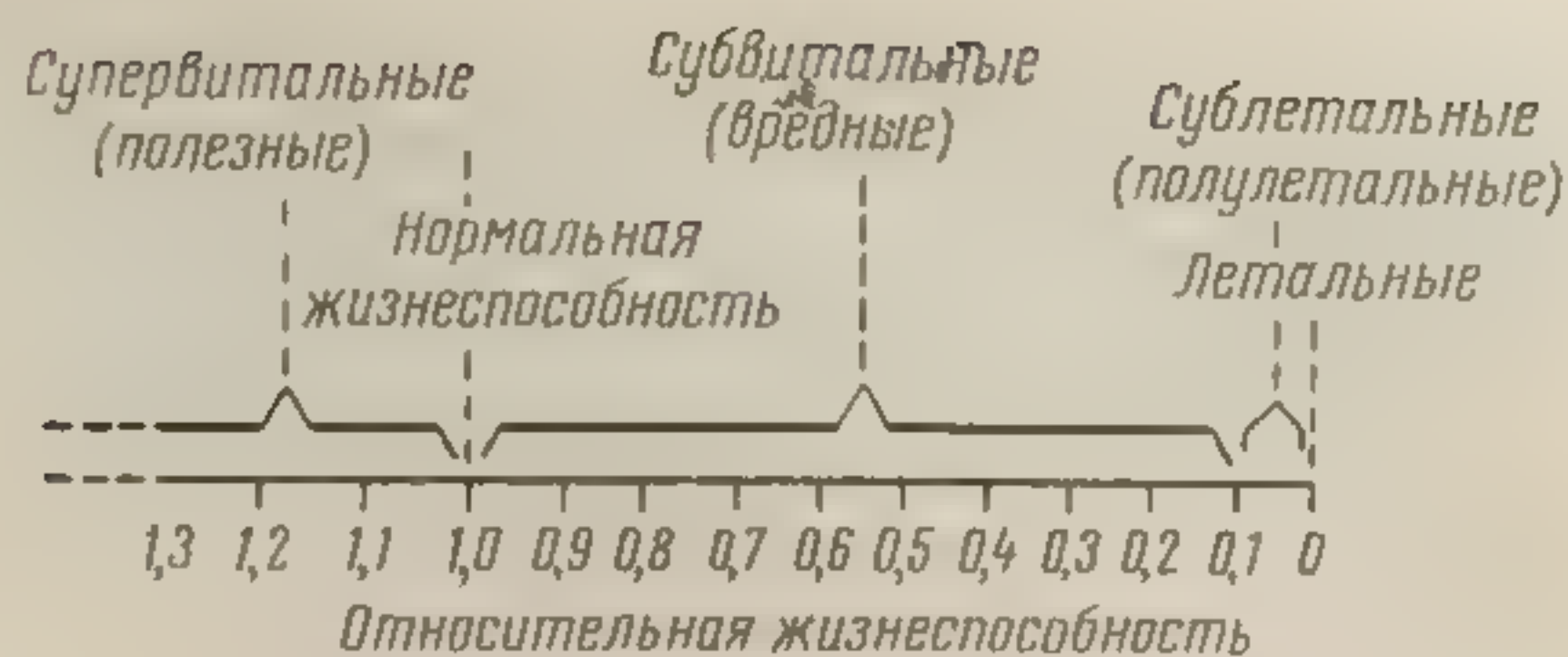
Было пок
в разной сте
полный спек
меньшей вре
(рис. 6—1). В
имеют различ
пов могут сил
дали значени
способности и пл
ленных для у

ПЛЕИОТРОПИЗ

Действует ли
множественны
Для ответа
в своих иссл
т. е. генетичес
линия была го
на по его аллел
никакого отно
бого органа, в
шение диамет
двух линий су
цвета глаз пл
тельствуют о т
ческих призна

РИС. 6-1.

Классификация мутаций по степени влияния на жизнеспособность



индекс l обозначает рецессивный летальный эффект гена, доминантного по желтой окраске Y , а индекс L обозначает доминантную нормальную жизнеспособность аллеля, рецессивного по нежелтой окраске y . Тогда скрещивание двух желтых мышей ($Y^l y^L \times Y^l y^L$) дает в F_1 : 1 $Y^l Y^l$ (гибнут) : 2 $Y^l y^L$ (желтые) : 1 $y^L y^L$ (нежелтые).

Как в случае львиного зева, так и в случае мышей гибель наступает из-за присутствия гена в гомозиготном состоянии. Гены, вызывающие гибель особи до наступления зрелости, называют *летальными генами*, или просто *летальными*. Гены, которые вызывают гибель только гомозигот, называют *рецессивными летальными*, гены же, действующие на гетерозигот — *доминантными летальными*. Летали могут проявлять себя как на самых ранних, так и на очень поздних стадиях развития, а также на любой промежуточной стадии. Иногда летальный эффект вызывается не одним геном или одной парой генов, а комбинированным действием нескольких неаллельных генов. В этом случае разные неаллельные гены приобретаются от обоих родителей и потомок погибает от того, что эти гены, жизнеспособные по отдельности, вместе летальны.

Было показано, что различные аллели, рецессивные и доминантные, в разной степени влияют на жизнеспособность. Эти эффекты составляют полный спектр, простирающийся от полной летальности к большей или меньшей вредности, вплоть до явной нейтральности и даже полезности (рис. 6—1). В тех случаях, когда разные комбинации аллелей или неаллелей имеют различную жизнеспособность, наблюдаемые соотношения фенотипов могут сильно отличаться от ожидаемых. В третьей главе мы уже обсуждали значение необходимых предосторожностей, касающихся жизнеспособности и плодовитости особей, которые используются в опытах, поставленных для установления принципов трансмиссионной генетики.

ПЛЕЙОТРОПИЗМ

Действует ли каждый ген только на один признак или он может оказывать *множественный плейотропный эффект*?

Для ответа на этот вопрос Т. Добжанский и А. Холтц использовали в своих исследованиях две линии дрозофилы, практически *изогенные*, т. е. генетически идентичные друг другу, за исключением того, что одна линия была гомозиготна по гену *красных глаз* (w^+), а другая — гомозиготна по его аллелю — гену *белых глаз* (w). Затем для сравнительного изучения в этих линиях был выбран другой признак, который явно не имеет никакого отношения к цвету глаз, а именно форма семеприемника — особого органа, в котором у самок хранится сперма. Было определено отношение диаметра семеприемника к его высоте и оно оказалось у мух этих двух линий существенно различным. Отсюда можно заключить, что ген цвета глаз плейотропен. Результаты других исследований также свидетельствуют о том, что многие гены плейотропны в отношении морфологических признаков.

Можно привести еще один пример с дрозофилой, у которой имеется рецессивный летальный ген *летальной полупрозрачности*, вызывающий полупрозрачность и гибель куколок. При использовании соответствующей методики можно сравнивать содержание разных химических веществ в крови нормальных личинок и куколок и в крови рецессивных летальных гомозигот (рис. 6 — 2). Так, Е. Хадорн показал, что ряд веществ присутствует в одинаковых количествах в крови обоих генотипов (пептид III), другие вещества встречаются в большем количестве у летальных особей (пептид I, пептид II, пролин), некоторых веществ у летальных особей меньше, чем у нормальных (глутамин), или вовсе нет (цистин). Отсюда очевидно, что плеiotропизм возможен также и на биохимическом уровне.

В случае желтых мышей аллель, определяющий желтую окраску в качестве доминантного эффекта, дает еще рецессивный летальный эффект. Исходя из предположения о том, что гомозиготы по этому аллелю, если бы они выжили, имели желтую окраску, а также учитывая, что между окраской шерсти и жизнеспособностью нет явной связи, можно заключить, что и в этом случае ген обладает плеiotропным действием.

У гималайских кроликов ($c^h c^h$) окраска обычно мозаична: на конечностях черная, а в остальных местах белая (глава I). Значит ли это, что данный аллель по-разному действует в разных частях тела. Поскольку у особей с таким генотипом, выращенных при низких температурах, мех совершенно черный, можно думать, что рассматриваемый ген дает только один эффект. И действительно, было обнаружено, что данный генотип образует фермент, необходимый для синтеза пигмента, причем фермент этот термолабилен и инактивируется при температуре, превышающей 34°C . Поэтому в таких частях тела, как конечности, температура которых в прохладном климате ниже 34° , образуется пигмент, тогда как на более теплых участках тела фермент инактивируется, и пигмент не образуется. Таким образом, гималайская окраска обусловлена одним аллелем, проявляющим только один эффект, который модифицируется действием внешних условий и в результате этого способен давать две фенотипические альтернативы одного и того же признака. Генетическое заболевание человека, так называемая

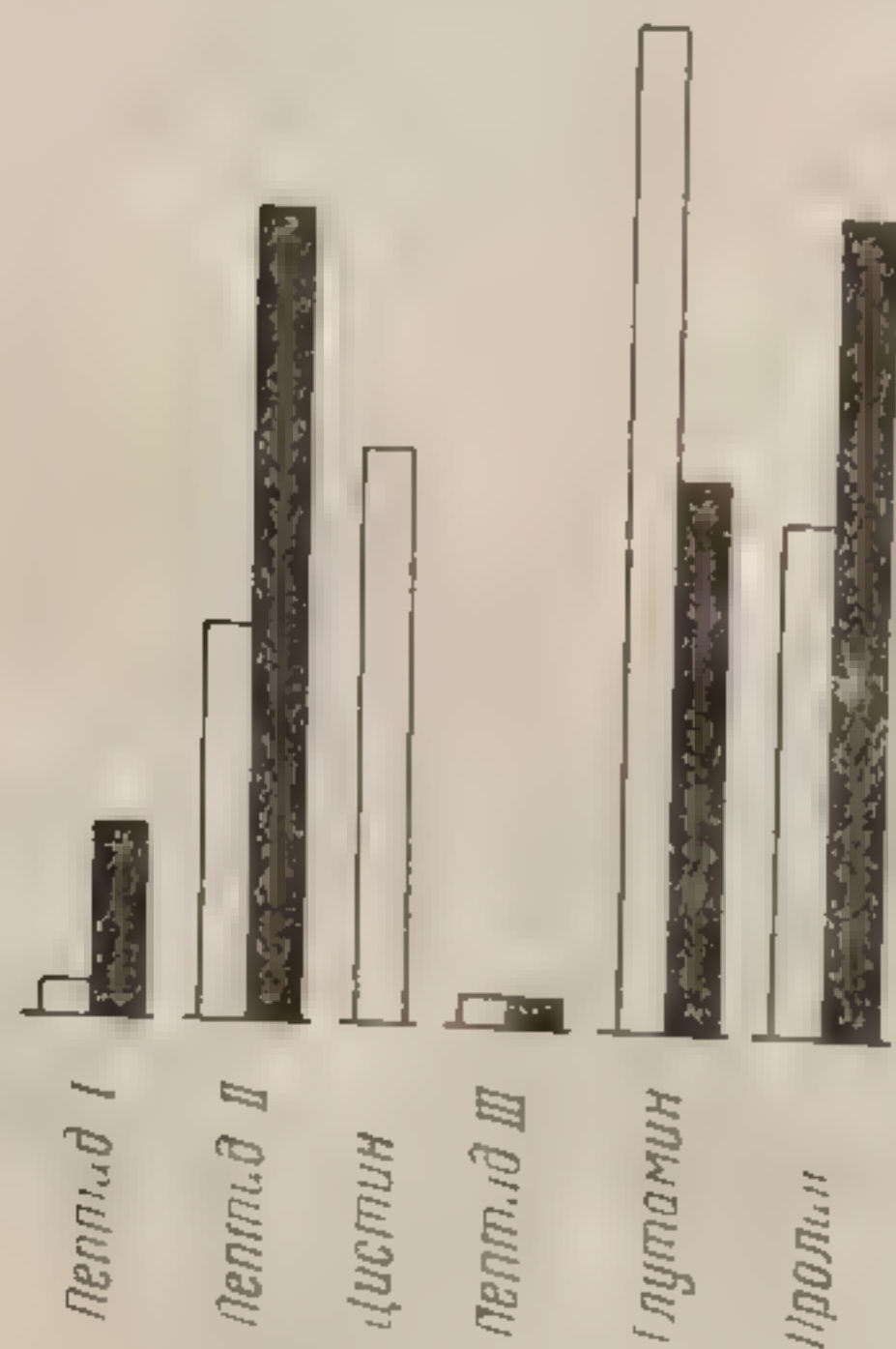


РИС. 6-2.

Плеiotропизм на биохимическом уровне

серповидноклеточная анемия, вызывается гомозиготностью по определенному аллелю. При этом заболевании наблюдаются либо по отдельности, либо во всех возможных комбинациях следующие симптомы: анемия, увеличенная селезенка, поражения кожи, сердца, почек и мозга. Поэтому гомозиготы по гену серповидноклеточной анемии, как правило, погибают в детском или юношеском возрасте. Этот аллель, следовательно, почти всегда действует как рецессивная леталь.

Было обнаружено, что у таких гомозигот эритроциты могут принимать серповидную форму вместо нормальной дискообразной (рис. 6—3). Серповидные клетки могут слипаться друг с другом и закупоривать кровеносные сосуды в различных частях тела, вызывая нарушения в функциях всех перечисленных выше органов.

Более того, эти дефектные эритроциты разрушаются, в результате чего развивается анемия.

РИС. 6-3.

Форма разл

А — нормальны

В — серповидны

Мы видим

типических

серповидност

исследования

наличием в э

ненормально

гемоглобином

Таким образо

серповидности

ненормальный

серповидность

шение красны

ты и анемию.

В этом слу

химическим де

многие химиче

на первый взг

исследований

можно даже пр

только одним ф

будет обнаруже

чаев, являются

причин, в котор

ричная причина

в начале этого

если не все, ген

над которым на

щил к плеiotро

ПЕНЕТРАНТНОСТИ

Анализ генетичес

ным выбором тех

ценными оказали

всегда проявляли

ных флуктуаций

Рассмотрим т

(рис. 6—4), р

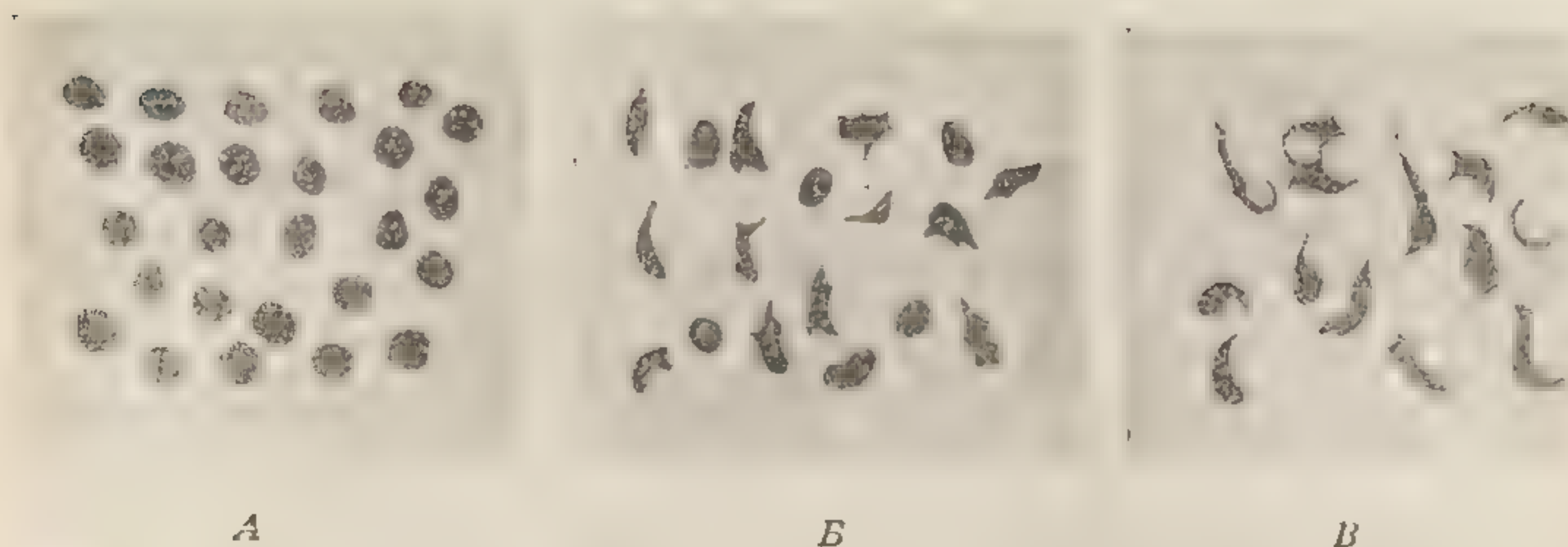


РИС. 6-3.

Форма различных типов эритроцитов человека

А — нормальные у нормальной гомозиготы; Б — серповидные клетки у мутантной гетерозиготы; В — серповидные клетки у мутантной гомозиготы

Мы видим, таким образом, что широкий спектр явно не связанных фенотипических проявлений гена серповидности является просто следствием серповидности красных кровяных клеток. Более того, биохимические исследования показывают, что серповидность, в свою очередь, обусловлена наличием в эритроцитах у особей, гомозиготных по гену серповидности, ненормального типа гемоглобина, у которого по сравнению с нормальным гемоглобином уменьшена способность участвовать в переносе кислорода. Таким образом, имеется *иерархия причин* множественного эффекта гена серповидности. Первой причиной является ген, второй — определяемый им ненормальный гемоглобин, третьей — обусловленная этим гемоглобином серповидность эритроцитов, четвертой — последующее слипание и разрушение красных кровяных телец, что вызывает большие органические дефекты и анемию.

В этом случае все плеiotропные эффекты обуславливаются одним биохимическим действием гена. Это единственное действие затрагивает затем многие химические реакции, которые играют роль в определении разных, на первый взгляд явно не связанных, признаков. Учитывая результаты исследований гималайских кроликов и серповидноклеточной анемии, можно даже предположить, что большинство, если не все гены, обладают только одним фенотипическим проявлением. Возможно, что со временем будет обнаружено, что плеiotропные эффекты, описанные для других случаев, являются третичными или еще более далекими эффектами в иерархии причин, в которой первопричина связана с действием одного гена, а вторичная причина еще не установлена. В качестве ответа на поставленный в начале этого раздела вопрос проще всего допустить, что *большинство, если не все, гены имеют только одно первичное фенотипическое проявление, над которым надстраивается иерархия вторичных проявлений, приводящих к плеiotропизму.*

ПЕНЕТРАНТНОСТЬ И ЭКСПРЕССИВНОСТЬ

Анализ генетического материала был в значительной мере облегчен удачным выбором тех признаков, которые мы избрали для изучения. Наиболее ценными оказались признаки, основанные на таких генотипах, которые всегда проявляли себя примерно одинаковым образом, независимо от обычных флуктуаций внешних условий.

Рассмотрим теперь родословную, в которой встречается *полидактилия* (рис. 6—4), редкая аномалия человека, при которой на конечностях имеется

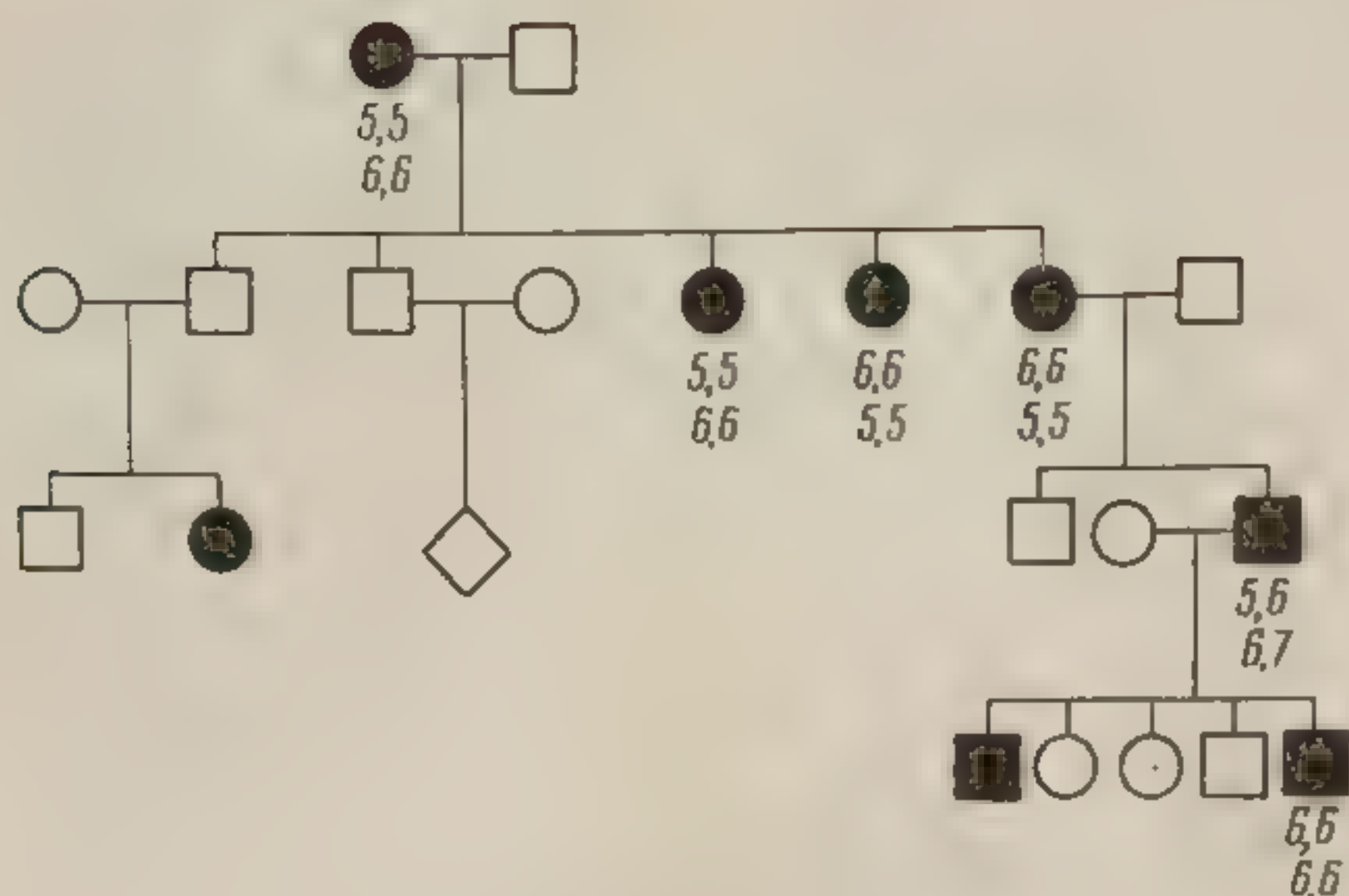


РИС. 6-4.

Родословная полидактилии у человека

больше пяти пальцев. У женщины, с которой начинается эта родословная, было по пяти пальцев на каждой руке и по шести пальцев на ногах. Ее муж по этому признаку был нормален. У этой четы было пятеро детей, среди которых трое страдали полидактилией. Отсюда можно предположить, что полидактилия определяется одним доминантным геном P и что мать обладала генотипом Pp , а отец — pp . С этим предположением согласуется тот факт, что у одной из дочерей, страдавшей полидактилией, от нормального мужа родилось два сына, один из которых имел лишние пальцы. У него, в свою очередь, было пятеро детей, и часть из них была нормальной, а у части была полидактилия.

Рассмотрим теперь левую ветвь этой родословной. Видно, что у первого нормального сына родилась тем не менее дочь с лишними пальцами. Как это можно объяснить? Можно предположить, что у сына был генотип pp , а его дочь являлась мутантом Pp , т. е. что аллель P образовался в результате мутации гена p и был передан дочери при оплодотворении. Против такого объяснения можно, однако, привести следующее возражение. Дело в том, что при изучении других родословных по полидактилии также обнаруживаются случаи, когда у двух нормальных родителей рождается ребенок с лишними пальцами. Поскольку полидактилия встречается редко, мутации p в P должны происходить еще реже. Следовательно, вероятность возникновения такой мутации в половых клетках одного или двух нормальных родителей очень мала. Крайне маловероятно, чтобы такая редкая мутация, происходящая случайным образом среди нормальных людей, так часто возникала у нормальных людей, входящих в родословную по полидактилии.

Другое объяснение состоит в том, что первый сын был на самом деле Pp , но ген P у него не проявлял себя заметным образом, хотя он и проявился у его дочери. Такое объяснение подтверждается характером проявления этого гена у тех членов этой родословной, которые страдали полидактилией. У некоторых было по пяти пальцев на руках, но лишние пальцы на ногах, или наоборот. У некоторых было разное количество пальцев на ногах или лишние пальцы на одной руке и пять на другой. Таким образом, очевидно, что по числу лишних пальцев проявление полидактилии очень разнообразно.

Поэтому, если полидактилия может не проявляться на одной конечности у индивидуума с генотипом Pp , то вполне вероятно, что иногда у таких индивидуумов полидактилия не проявляется ни на одной конечности.

Способность данного гена или комбинации генов проявлять себя тем или иным образом фенотипически называется *пенетрантностью*. Пене-

трантность гена P в гетерозиготном состоянии меньше 100%, так как иногда он не дает никакого заметного фенотипического эффекта. Если про человека с лишними пальцами можно с уверенностью утверждать, что он несет ген P , то нормальный фенотип может быть обусловлен как генотипом Pp , так и pp . Поскольку полидактилия встречается редко, то обычно можно смело утверждать, что нормальный человек, вступающий в брак с представителями семьи, в которой встречается ген P , представляет собой pp .

Проявление гена P в гетерозиготном состоянии чрезвычайно варьирует не только в отношении числа и расположения лишних пальцев, но и в степени их развития. Для описания характера или степени выражения гена, оказавшегося пенетрантным, употребляется термин *экспрессивность*.

Таким образом, у тех индивидуумов, у которых ген P в гетерозиготном состоянии не пенетрантен, нет и экспрессивности, а у которых ген P пенетрантен, его экспрессивность варьирует.

Какие причины вызывают вариации в пенетрантности и экспрессивности? Опыты, поставленные на генетически чистых линиях морских свинок, показали, что полидактилия чаще всего встречается в пометах более молодых матерей. В этом случае физиологические изменения, связанные с возрастом, изменяют пенетрантность. В другом случае в генетически однородной линии дрозофилы, когда мухи развивались в условиях повышенной влажности, наблюдался больший процент пенетрантности фенотипа «аномальное брюшко». Эти примеры показывают, что различия внешних условий могут вызвать различия в пенетрантности между особями с идентичными генотипами.

Мы уже знакомы с влиянием вариаций генотипа на пенетрантность при практически постоянных внешних условиях. В случае полной или частичной доминантности пенетрантность аллеля может зависеть от природы его аллельного партнера, а пенетрантность одного или пары аллелей может модифицироваться эпистатически-гипостатическими взаимодействиями с неаллельными генами (глава 4). Аналогично можно показать, что различия в экспрессивности гена могут быть следствием различий как во внешних условиях, так и в генотипе.

Необходимо четко различать пенетрантность и экспрессивность, с одной стороны, и доминантность и эпистаз — с другой. Допустим, что TT приводит к появлению только высоких особей, $T'T'$ — только низких, а TT' — только особей среднего роста. Хотя у гибридов или совсем нет доминирования, или имеет место неполное доминирование, все три генотипа обладают стопроцентной пенетрантностью. Когда среди особей среднего роста наблюдаются некоторые вариации (за счет влияния среды или всего остального генотипа), мы имеем дело с различной экспрессивностью генотипа TT' , пенетрантного на 100%. Случаи же, когда по тем же причинам изредка проявляются низкие особи с генотипом TT' , служат примером отсутствия пенетрантности T в сочетании TT' .

Термины *пенетрантность* и *экспрессивность* используются для сравнения фенотипических проявлений у разных особей, генетически идентичных по определенному признаку. Это значит, что если в данной особи ген фенотипически проявил себя, он оказался пенетрантным и все остальные фенотипические сравнения между пенетрантными особями проводятся в терминах экспрессивности. Однако можно говорить и о пенетрантности внутри одного организма, если данный генотип может проявить себя в двух или нескольких частях тела. Так, в случае полидактилии ген P может с равной вероятностью проявиться на руках и на ногах. Таким образом, генотип может быть пенетрантным на одной руке (шесть пальцев) и не пенетрантным на другой (пять пальцев). Он может быть пенетрантен на ногах (на каждой ноге по шесть пальцев, что можно обозначить 6.6), но не на

руках (5.5). Когда показана разница в пенетрантности (или экспрессивности) в парных органах одной и той же особи (например, на одной руке семь пальцев, а на другой — шесть, или на одной руке один большой лишний палец, а на другой руке — один маленький лишний палец), то можно с уверенностью утверждать, что эти различия имеют не генетическую природу, а вызваны внешними условиями.

Однако при сравнении пенетрантности и экспрессивности у разных особей часто невозможно с уверенностью сказать, обусловлены ли те или иные черты сходства и различия генотипом или средой, если эти два фактора варьируют неконтролируемым образом, что уже обсуждалось в первой главе.

ИЗУЧЕНИЕ БЛИЗНЕЦОВ У ЧЕЛОВЕКА

Для всех организмов, за исключением человека, можно так контролировать условия экспериментов, что на основании поведения стандартного генотипа при разных внешних условиях можно установить роль среды в изменчивости фенотипов; помещая в стандартные условия различные генотипы, можно узнать, насколько отличаются фенотипы, определяемые этими генотипами. Ни среда, в которой находится человек, ни его генотип не подвластны экспериментальному контролю. Как же можно определить, в какой мере данный признак человека контролируется генотипом и в какой мере — средой? К счастью, этот вопрос о взаимоотношении генотипа и среды можно изучать, используя результаты наблюдений над некоторыми естественно происходящими явлениями.

Каждый индивидуум состоит из большого числа частей, которые, по всей вероятности, обладают одинаковым генотипом. Соответственно, как уже говорилось, можно приписать влиянию среды любые фенотипические различия в пенетрантности и экспрессивности, если они встречаются в парных частях тела. Например, человек, гетерозиготный по гену полидактилии и имеющий шесть пальцев на одной руке и пять на другой, иллюстрирует собой те границы, в которых среда может влиять на этот признак. Однако, когда речь идет о признаке, который относится к особи в целом или проявляется в одной или нескольких непарных частях тела, то роль среды можно выявить, только сравнивая разные генетически идентичные особи.

Поскольку каждый человек гетерозиготен по довольно большому числу генов, вероятность появления двух генетически идентичных *сибсов* (т. е. детей одних и тех же родителей) очень мала. Однако у человека могут появиться два или больше генетически идентичных *сибсов* в результате бесполого размножения, которое происходит следующим образом. Вначале оплодотворенное яйцо развивается нормально, претерпевая серию митотических делений. Однако в какой-то момент образовавшиеся в результате этих делений клетки теряют связь друг с другом и распадаются на две или большее число групп, каждая из которых может развиваться в целую особь. Каждый индивидуум, образовавшийся таким образом, генетически идентичен (если пренебречь мутациями) всем остальным индивидуумам, возникшим из того же оплодотворенного яйца. Разделение, о котором шла речь, может произойти на разных стадиях раннего эмбриогенеза, и в разных группах может оказаться неодинаковое количество клеток. Такое разделение может даже происходить несколько раз на разных стадиях развития одной и той же зиготы. Индивидуумы, образовавшиеся таким бесполом путем, называются *идентичными*, или *однояйцевыми*, двойняшками, тройняшками, четверняшками и т. д. Мы рассмотрим здесь лишь идентичные двойняшки, так как рождение большего числа идентичных близнецов происходит столь редко, что практически не может быть использовано для изучения проблемы взаимодействия среды и генотипа.

Близнецы
родиться и в ро
го воспроизведе
случае двойня
двух разных я
дотворенных
сперматозоидам
цы генетически
в этом отношен
на друга не бол
родившиеся в ра
этому их назыв
ными, или *двуя*
нецами.

Существование
типов близнецов
ки материал для
носительной роли
среды в определе
Если пренебреж
генотипы однояй
цов идентичны, а
вия для обоих тип
очень схожи до ро
ли они росли вместе
рождения.

Фенотипические
между идентичными
ми, росшими вместе
лены почти иск
внешними условиями
Можно сравнить сред
чия между такими ид
близнецами со средн
чиями между идентич
нецами, которые по
иним причинам росли
Такое сравнение дает
ление о влиянии на фен
восительно больших п
них малых различий
идентичных, так и неиде
близнецы, выросшие вме
ходятся в условиях, ко
среднем варьируют в од
средних различий между
тичными и между неидент
ми близнецами дает во
ность оценить роль генот
наблюдаемых различий
того чтобы собрать данн
двуяйцевыми или однояй
Для того чтобы до
сравнить их по бо

Близнецы у человека могут родиться и в результате полового воспроизведения. В этом случае двойня образуется из двух разных яйцеклеток, оплодотворенных двумя разными сперматозоидами. Такие близнецы генетически неидентичны и в этом отношении похожи друг на друга не больше, чем сибсы, родившиеся в разное время. Поэтому их называют *неидентичными*, или *двуяйцевыми*, близнецами.

Существование двух таких типов близнецов дает нам в руки материал для выяснения относительной роли генотипа и среды в определении фенотипа. Если пренебречь мутациями, генотипы однояйцевых близнецов идентичны, а внешние условия для обоих типов близнецов очень схожи до рождения, а если они росли вместе, то и после рождения.

Фенотипические различия между идентичными близнецами, росшими вместе, обусловлены почти исключительно внешними условиями (рис. 6—5). Можно сравнить средние различия между такими идентичными близнецами со средними различиями между идентичными близнецами, которые по тем или иным причинам росли порознь. Такое сравнение дает представление о влиянии на фенотип относительно больших и относительно малых различий во внешних условиях. Поскольку как идентичные, так и неидентичные близнецы, выросшие вместе, находятся в условиях, которые в среднем варьируют в одинаковых пределах, то сравнение средних различий между идентичными и между неидентичными близнецами дает возможность оценить роль генотипа в наблюдаемых различиях. Для того чтобы собрать надежные данные о близнецах необходимо уметь различать в каждом данном случае, являются ли рассматриваемые близнецы двуяйцевыми или однояйцевыми.

Для того чтобы доказать, что два близнеца неидентичны, лучше всего сравнить их по большому числу признаков, определяемых генами со сто-



РИС. 6-5.

Идентичные близнецы Айра и Джоэл
в возрасте $3\frac{1}{2}$ месяцев, 8 и 19 лет

процентной пенетрантностью и достаточно постоянной экспрессивностью. К таким признакам относятся пол, цвет глаз, группы крови *ABO*, *ML*, *Rh* и другие. Естественно, что для проверки двуяйцевого происхождения близнецов можно использовать лишь те признаки, по которым гетерозиготен хотя бы один из родителей. Предполагая, что мутации отсутствуют, достаточно отличия по одному такому признаку для доказательства неидентичности близнецов. (В соответствии с этим критерием близнецов противоположного пола можно сразу считать неидентичными). Различие по двум таким признакам делает заключение совершенно бесспорным, поскольку возникновение двух мутаций среди ограниченного числа признаков, сравниваемых у двух идентичных близнецов, столь маловероятно, что практически невозможно.

Определение идентичности близнецов основано на таком же сравнении фенотипов. С увеличением числа признаков, по которым не наблюдается различий, увеличивается вероятность идентичности близнецов. Когда число признаков, на основании которых судят о генотипе близнецов, достаточно велико, то если бы они были неидентичны, между ними обязательно наблюдалось бы одно или два различия. Следовательно, отсутствие различия по всем этим признакам можно приписать тому, что генотипы близнецов идентичны и что они оба произошли из одной зиготы.

Опишем в общих чертах методы изучения на близнецах относительной роли генотипа и среды в образовании определенных признаков. Необходимо подсчитать отдельно процент идентичных и неидентичных двоен, выросших вместе, у которых один или оба близнеца обладают изучаемым признаком. Допустим, что мы хотим изучать *группу крови ABO*. Необходимо определить *коэффициент совпадения*, или *конкордантность*, т. е. процент идентичных и неидентичных пар, в которых оба близнеца обладают одинаковым феноменом. Для идентичных близнецов конкордантность по группе крови *ABO* оказалась равной 100%.

При определении конкордантности у неидентичных близнецов обычно учитываются данные только по близнецам одного пола. Это правило необходимо соблюдать потому, что условия, в которых живут после рождения близнецы противоположного пола, отличаются, как правило, больше, чем у близнецов одного пола. (Когда различаются и генотип, и условия, в которых живут два типа близнецов, то мы уже не сможем определить, что именно вызвало большие фенотипические различия между неидентичными близнецами.) Поэтому мы воспользуемся данными только о близнецах одного пола.

У неидентичных близнецов конкордантность по группам крови *ABO* равна примерно 64%. Какие можно отсюда сделать заключения? Если бы конкордантность была одинаковой у обоих типов близнецов (100 или 64%), мы должны были бы сделать вывод, что в отношении групп крови между ними нет ни генетических различий, ни разницы во внешних условиях. Однако в действительности конкордантность отличается, причем отличается в определенном направлении. Стопроцентная конкордантность идентичных близнецов говорит о том, что данный признак определяется генетически и имеет стопроцентную пенетрантность, несмотря на имеющее место в норме колебание внешних условий. Меньшую конкордантность неидентичных близнецов нельзя даже отчасти приписать действию внешней среды, так как такие же колебания условий у идентичных близнецов не вызвали таких различий. Меньшую конкордантность, следовательно, необходимо приписать разнице в генотипах неидентичных близнецов по этому признаку. Конечно, мы могли предсказать этот результат на основании ранее рассмотренных данных, которые показали, что система групп крови *ABO* определяется генетически и имеет полную пенетрантность. Меньшая конкордантность у неидентичных близнецов является следствием того, что они приобрели от своих родителей разные генотипы, поскольку один или оба родителя были гетерозиготны по I^A или I^B .

Гетерозиготы
типичных близне-
ств различиям
непов.

Рассмотрим
которым фенотип
ность у идентич-
ных. Превышен
генотипов идентич-
нецов в 3% можн
ствием среды, а
Поскольку на осн
ду этими возможн
индивидуумов, по
косолопость при
предел влияния ге

Среди идентич-
косолопым. Отсут
кордантность иден-
в условиях среды у
чить, что среди бл
же внешних услови
чаев обусловлена в
ляет примерно 71%

Изучение конко-
сительный вклад ге-
рассмотренном при-
говорят нам о харак-
деляется генотипом,
деляется средой. Оп-
кой информации о в-
вий, выходящих за
выросших вместе. Д
близнецов, на попул-
ние условия для бли-
предположение не вс-

Конкордантность
в 28% у неидентичн-
нецов подвержены д-
пени, то предрасполо-
ляется генетически, а
о том, что более высо-
генетическую природу
обычно страдают оди-
сли и те же органы и
идентичных конкордан-
Конкордантность в
вых близнецов и 6%

рис. 6-8.

Дискордантность
индивидуумов) и
конкордантности по
психологическим
нам физическим
вместе

Теоретически возможно получить меньшую конкордантность у идентичных близнецов, чем у неидентичных. Такое различие следует приписать различиям в условиях жизни, причем бóльших для идентичных близнецов.

Рассмотрим результаты изучения у близнецов конкордантности по некоторым физическим признакам (рис. 6—6). По косолапости конкордантность у идентичных близнецов составляет 32% и только 3% у неидентичных. Превышение на 29% (32%—3%) следует приписать идентичности генотипов идентичных близнецов. Конкордантность неидентичных близнецов в 3% может быть обусловлена как сходством генотипов, так и действием среды, а также какой-нибудь комбинацией этих двух факторов. Поскольку на основании приведенных данных нельзя сделать выбор между этими возможностями, можно заключить, что у близнецов или других индивидуумов, подверженных такому же влиянию среды, как и близнецы, косолапость примерно в 29% случаев обусловлена генотипом. Верхний предел влияния генотипа не превышает 32%.

Среди идентичных близнецов в 68% случаев второй близнец не был косолапым. Отсутствие совпадения называется *дискордантностью*. Дискордантность идентичных близнецов в 68% можно приписать различиям в условиях среды у двух данных близнецов. Можно, следовательно, заключить, что среди близнецов или других индивидуумов, находящихся в тех же внешних условиях, что и близнецы, косолапость примерно в 68% случаев обусловлена влиянием среды. Верхний предел влияния среды составляет примерно 71%.

Изучение конкордантности — дискордантности выявляет только относительный вклад генотипа и среды в конкретный фенотип (в только что рассмотренном примере — косолапость). Такие исследования ничего не говорят нам о характере среды в том случае, когда данный фенотип определяется генотипом, и ничего не говорят о генотипах, когда фенотип определяется средой. Описанные исследования близнецов не дают также никакой информации о влиянии на пенетрантность косолапости внешних условий, выходящих за рамки вариаций среды, наблюдаемых у близнецов, выросших вместе. Для перенесения выводов, полученных при изучении близнецов, на популяцию в целом необходимо предположить, что внешние условия для близнецов и неблизнецов были одинаковы; однако такое предположение не всегда справедливо.

Конкордантность по *туберкулезу* равна 74% у идентичных близнецов и 28% у неидентичных близнецов. Если предположить, что оба типа близнецов подвержены действию туберкулезных бактерий в одинаковой степени, то предрасположенность к этому заболеванию на 46—74% определяется генетически, а на 26—54% — условиями среды. Предположение о том, что более высокая конкордантность у идентичных близнецов имеет генетическую природу, подтверждается тем, что конкордантные близнецы обычно страдают одной и той же формой заболевания, затрагивающего одни и те же органы и протекающего с одинаковой тяжестью. Среди неидентичных конкордантных близнецов такое сходство наблюдается реже.

Конкордантность в случае *полиомиелита* составляет 36% для идентичных близнецов и 6% — для неидентичных. Здесь, как и в случае тубер-

РИС. 6-6.

Дискордантность (незаштриховано) и процент конкордантности (заштриховано) по различным физическим признакам близнецов, выросших вместе

Группы крови ABO

Косолапость

Туберкулез

Полиомиелит

| | Однояйцевые | Двужайцевые |
|------------------|-------------|-------------|
| Группы крови ABO | 100 | 64 |
| Косолапость | 32 | 3 |
| Туберкулез | 74 | 28 |
| Полиомиелит | 36 | 6 |

кулеза, возникновение заболевания, по-видимому, не зависит от возбудителя, так как большинство людей в норме инфицировано им. Соответственно возникновение заболевания зависит от условий среды в 64—70% случаев и от генотипа — в 30—36%. Тот факт, что по *кори* конкордантность очень велика среди близнецов обоих типов, говорит просто о том, что любая генетическая причина подверженности этому заболеванию распределена очень равномерно среди той популяции, из которой взяты выборки близнецов.

Относительный вклад генотипа и среды в умственные и психические признаки также можно изучать с помощью метода близнецов. Разные люди предпочитают слышать разные частоты звука работающего метронома. Такое «предпочтение частоты» можно рассматривать как один из компонентов, характеризующих психические особенности человека. Проверка «предпочтения частоты» идентичными близнецами показала, что разница в их выборе составляет 7,8 условных единиц (табл. 6—2). Эта разница почти не отличается от разницы в выборе, полученной при нескольких проверках одного и того же человека (8,7 условных единиц). Однако для неидентичных близнецов получена разница в 15 единиц, что значительно отличается от данных для идентичных близнецов. Сибсы, родившиеся в разное время, давали разницу в 14,5 единиц, т. е. в этом отношении они не отличались от неидентичных близнецов. И, наконец, люди, не состоящие в родстве, давали разницу в 19,5 единиц. Так как с увеличением генетического сходства уменьшается разница в выборе предпочитаемой частоты, можно заключить, что данный признак имеет генотипическую основу.

Таблица 6—2

ВАРИАЦИИ В ПРЕДПОЧТЕНИИ ЧАСТОТЫ
(по К. Штерну)

| Индивидуумы | Разница в выборе |
|---|---------------------|
| Одно и то же лицо при разных проверках | 8,7 |
| Однородные близнецы | 7,8 |
| Двухродные близнецы | 15,0 |
| Сибсы | 14,5 |
| Не родственники | 19,5 |

Изучение близнецов в отношении такого психического заболевания, как *шизофрения*, показывает, что конкордантность составляет 86% у идентичных близнецов и 14% у неидентичных. Однако условия среды не одинаковы для двух типов близнецов и большая дискордантность неидентичных близнецов обусловлена большими различиями в социальном окружении. Тем не менее, подтверждением того, что не все случаи конкордантности идентичных близнецов определяются сходством внешней среды, служат два случая, когда два идентичных близнеца были разлучены, выросли в разных условиях и тем не менее оба заболели примерно в одном и том же возрасте.

Известно, что разные люди не одинаково отвечают на вопросы при обследовании *I. Q.* (методом «коэффициента интеллектуальности»). Способность правильно отвечать на вопросы при таких обследованиях можно использовать как *меру интеллектуальности*. В то время как отметки не родственников варьируют в больших пределах вокруг 100, разница между отметками близнецов, выросших вместе, составляет всего 3,1 для идентичных и 8,5 для неидентичных близнецов. Очевидно, идентичность генотипов делает вероятной одинаковую оценку. Проверка идентичных близнецов, выросших раздельно, дает разницу, равную 6. В этом случае чем больше

разница во
тичных бли
росших вме
жен влияни
Для гру
факторов,
Хотя опи
ляют решит
тическими р
нии, числе
триваемый п
ЭФФЕКТ ДЕЙ

Многие мута
живаются у
ному морфоло
изменение об
новится заме
Каким образ
никновению
рос необходим
действия гена
тики. Частн

Рассмотрим
ную при изуче
Ф. Гамбургер
с такими корот
а ползают. На
ным фенотипом

При генети
дующие резуль
ных особей дал
коротконогих
ства 775 коро
с соотношением
куры гетерозиг
коротконогости
тается, что соот
мутант *Ср Ср* по
ная леталь, под
имевших нормал
родителей. Было
случае гибнет на

В чем же закл
себя как рецесси
++ дающего по
в течение первых
дня, т. е. почти
СрСр изображена
в сравнимом возр
целевидны, мень
мы, тело уменьше
бумаги, на которой
При изучении
бации зачатки ног
логическое прояв

разница во внешних условиях, тем больше разница и в способностях идентичных близнецов, но все же она меньше, чем у неидентичных близнецов, росших вместе. Таким образом и признак интеллектуальности подвержен влиянию как генетических факторов, так и условий среды.

Для групп крови *ABO* мы уже рассмотрели природу генетических факторов, ответственных за данный фенотип.

Хотя описанные в этой главе методы (метод близнецов и другие), позволяют решить, связано ли наличие или отсутствие данного фенотипа с генетическими различиями, они не дают никакой информации о расположении, числе и рекомбинационных свойствах генов, определяющих рассматриваемый признак.

ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ

Многие мутации, существующие уже в гаметах до оплодотворения, обнаруживаются у многоклеточных растений и животных по какому-либо заметному морфологическому изменению, ими вызываемому. Это фенотипическое изменение обычно может быть обнаружено невооруженным глазом и становится заметным спустя значительное время после начала развития. Каким образом мутация изменяет нормальное развитие, приводит к возникновению нового морфологического признака? Для ответа на этот вопрос необходимо знать, как проявляется фенотип любого рода в результате действия гена. Этот вопрос является предметом изучения для *феногенетики*. Частным разделом феногенетики является *генетика развития*.

Рассмотрим генетическую и феногенетическую информацию, полученную при изучении одного конкретного случая, описанного В. Ландауером, Ф. Гамбургером, Д. Рудником и Л. Данном. У кур встречаются особи с такими короткими ногами, что создается впечатление, будто они не ходят, а ползают. На рис. 6—7 изображен коротконогий петух с таким ненормальным фенотипом (*сгеерг*) в сравнении с нормальным петухом.

При генетических исследованиях этого фенотипа были получены следующие результаты: реципрокное скрещивание коротконогих и нормальных особей дало соотношение обоих фенотипов, равное 1 : 1. Скрещивание коротконогих кур между собой дало при наблюдении взрослого потомства 775 коротконогих и 388 нормальных, что идеально совпадает с соотношением 2 : 1. Поэтому разумно предположить, что коротконогие куры гетерозиготны по одной паре расщепляющихся генов, в которой ген коротконогости *Ср* доминирует над своим нормальным аллелем $+$. Считается, что соотношение 2 : 1 свидетельствует о том, что гомозиготный мутант *Ср Ср* погибает. Возможность того, что *Ср* действует как рецессивная леталь, подтверждается сравнением частоты выживания эмбрионов, имевших нормальных родителей, и эмбрионов, имевших коротконогих родителей. Было обнаружено, что на третий день инкубации во втором случае гибнет на 25% больше эмбрионов, чем в первом.

В чем же заключается феногенетическое действие *Ср Ср*, проявляющего себя как рецессивная леталь: *Ср +*, дающего «ползающий» фенотип и $++$, дающего нормальный фенотип? Хотя эмбрионы *Ср Ср* обычно гибнут в течение первых трех дней инкубации, изредка они выживают до 19-го дня, т. е. почти до момента вылупления из яйца. Такая гомозигота *Ср Ср* изображена слева на рис. 6—8 (справа изображен нормальный эмбрион в сравнимом возрасте). У нее наблюдаются следующие аномалии: глаза щелевидны, меньше, чем в норме, и лишены век, голова неправильной формы, тело уменьшено, скелет не окостенел и, как видно на фоне черной бумаги, на которой лежит эмбрион, хорошо сформировались только пальцы.

При изучении развития *Ср +* было обнаружено, что на 7-й день инкубации зачатки ног у них короче, чем у нормальных эмбрионов. Это морфологическое проявление действия *Ср* является результатом каких-то собы-

тий, происходящих на более ранних стадиях развития, поскольку в возрасте 48 час. (рис. 6—9) эмбрион $Sr +$ (слева) меньше, чем нормальный (справа), хуже развит и его головной конец еще не изогнут. Более того, эти различия можно обнаружить даже 12 часами раньше, т. е. после 36 час. инкубации.

Как у гомозигот, так и у гетерозигот по гену Sr нарушена дифференциация хряща. $Sr +$ особи страдают заболеванием, которое называется *хондродистрофией* (или *ахондроплазией*), а особи $Sr Sr$ — заболеванием, которое называется *фокомелией*. Оба заболевания были известны у человека уже более 100 лет тому назад. Когда оба родителя являются хондродистрофиками, часть детей страдает фокомелией и имеет сильно деформированные конечности. Такое состояние можно приписать наличию мутантного гена (подобного гену Sr у кур) в двойной дозе, т. е. гомозиготном состоянии.

Уже говорилось, что на 36-м часу инкубации особи $Sr +$ развиваются медленнее особей $++$. В норме на этой стадии зачатки задних конечностей растут очень быстро, в то время как остальные ткани растут сравнительно медленно. Если Sr в единичной или двойной дозе приводят к общему замедлению роста, то наиболее затронуты будут структуры, которые в данный момент растут быстрее других. Поэтому следует ожидать, что такое генетически обусловленное замедление роста, начинающееся как раз в этот определенный момент развития (36 час.), приведет к уменьшению размеров задних конечностей и длинных костей передних конечностей.

Не следует, однако, делать вывода, что ткань, из которой развиваются задние конечности, совершенно пассивна по отношению к действию Sr и что единственный ее ответ — это замедление роста. Можно исследовать поведение зачатка будущих задних конечностей в опытах с пересадками. Если эту ткань, взятую от нормального эмбриона, пересадить другому нормальному эмбриону впереди от его собственного зачатка конечности, она разовьется в нормальную конечность. Если же ткань будущей задней конечности взять от эмбриона, гомозиготного по гену Sr , и также пересадить нормальному эмбриону, то она разовьется в мутантную конечность. Этот результат свидетельствует о том, что даже на очень ранних стадиях развития, когда нет еще самих конечностей, судьба их тканей у мутанта уже окончательно предопределена генотипом Sr , т. е. способностью, или *компетентность*, к нормальному развитию уже потеряна.

Не следует также делать вывода, что все ненормальные ткани, которые обнаруживаются у гомозигот $Sr Sr$, были детерминированы на ранних стадиях эмбриогенеза и могут развиваться только так, как это свойственно

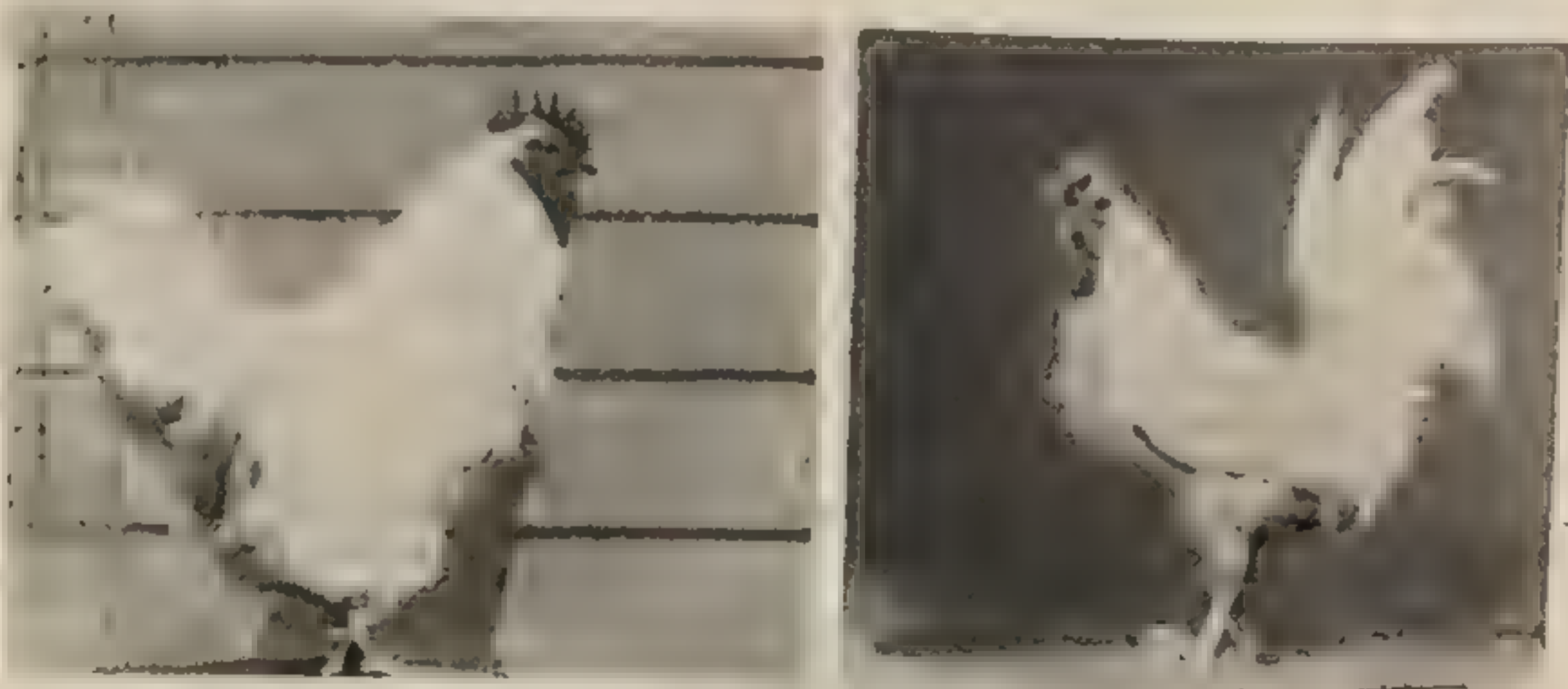


РИС. 6-7.

Нормальный (справа) и коротконогий (слева) петухи



РИС. 6-8.
 Нормальная (справа) и коротконогая (слева) гомозиготы примерно на 19-м дне развития

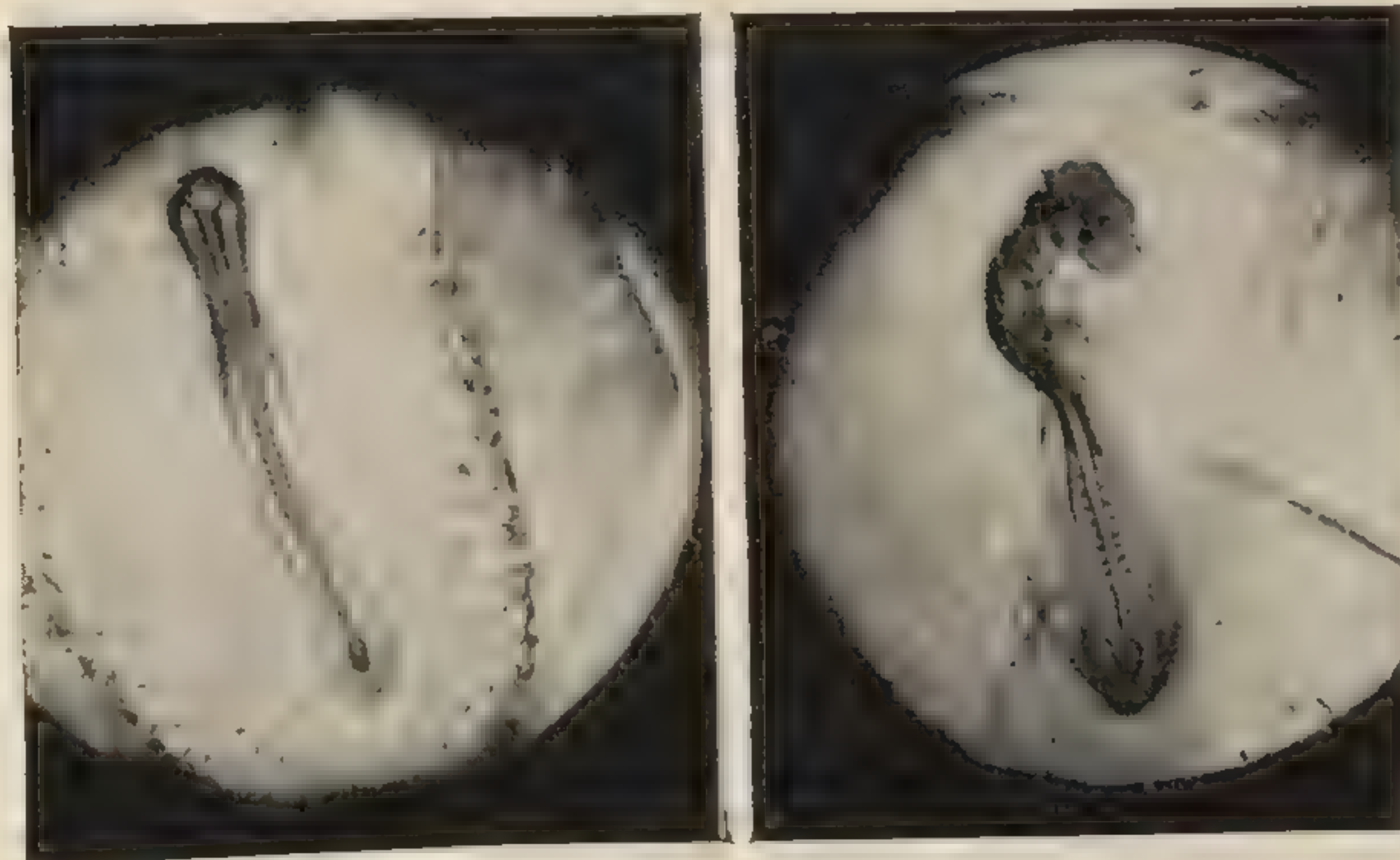


РИС. 6-9.
 Нормальный (справа) и коротконогий (слева) гетерозиготные эмбрионы примерно на 48-м часу развития

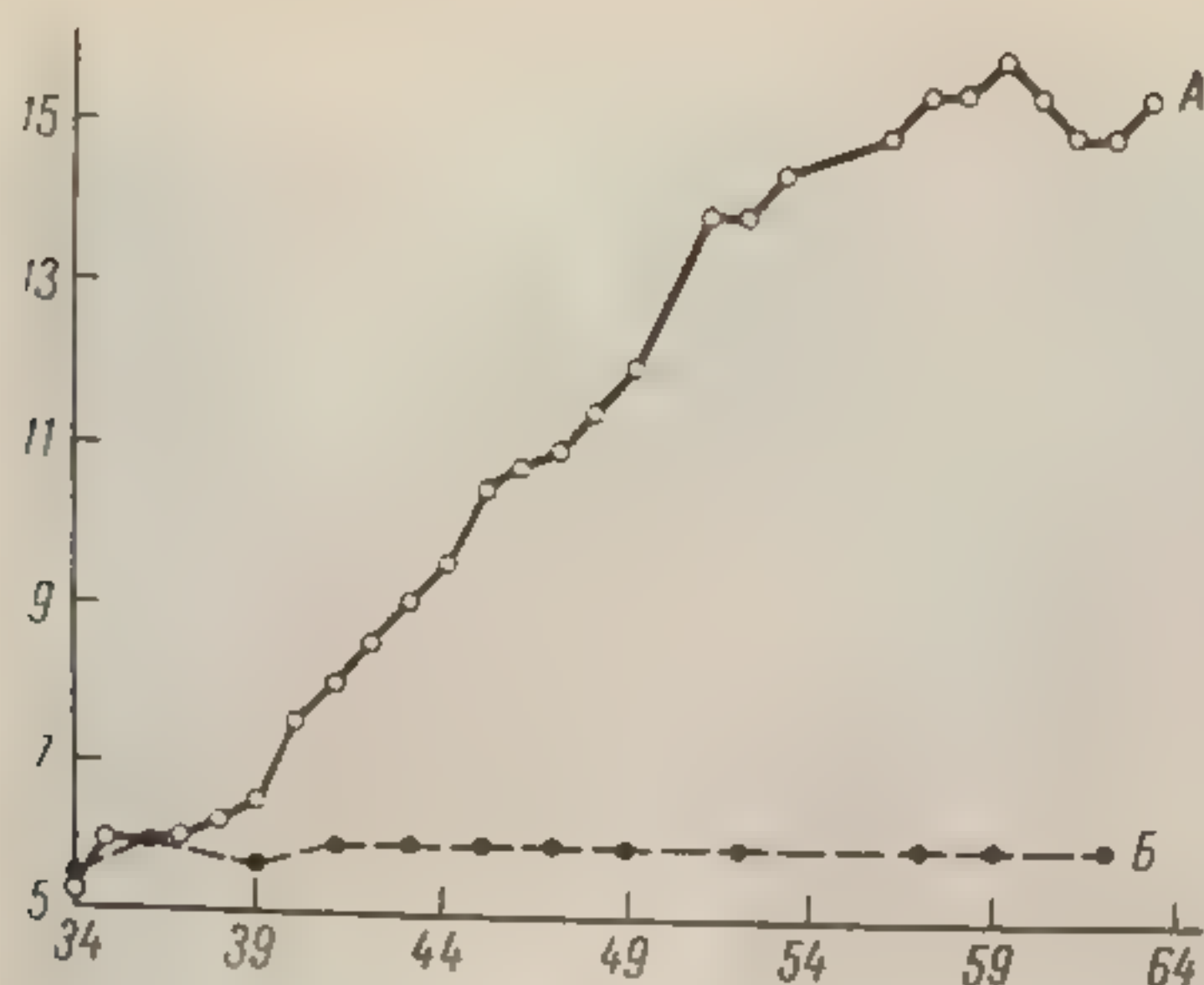


РИС. 6-10.

Влияние инъекции карликовым мышам экстрактов из гипофиза. По оси ординат — вес (в г), по оси абсцисс — возраст (в днях). Объяснение в тексте

с нормальной компетентностью не получает, по-видимому, достаточного питания вследствие слабой циркуляции, обусловленной этим генотипом. Эта гипотеза подтверждается данными двух родов: во-первых, недифференцированные ткани эмбрионов *SrSr*, помещенные в полноценную культуральную среду, растут совершенно нормально, хотя все же ткань сердца не растет так же хорошо, как нормальная, во-вторых, когда зачатки конечностей нормальных эмбрионов помещают в обедненную питательную среду, в них развивается много признаков, характерных для конечностей *SrSr*.

Изучение коротконогих кур показало, что множественный эффект этой мутации, обнаруженной по завершении развития, обусловлен изменениями, вызванными геном *Sr*, которые возникли в процессе развития гораздо раньше. Действительно, на основании судьбы будущих конечностей у эмбрионов *Sr* мы можем заключить, что генотип вызывает определенные изменения, предшествующие морфологическим. Ген *Sr*, очевидно, изменяет физиологию особи так, что общий рост замедляется и определяется будущая судьба некоторых тканей, а обнаруживаемые впоследствии морфологические изменения являются уже прямым следствием этих изменений. Физиологические изменения, вызванные геном, можно в свою очередь приписать изменениям в биохимических реакциях клеточного метаболизма.

В случае коротконогих кур явно имеют место генетически детерминированные метаболические сдвиги, происходящие в определенных клетках (что приводит к нарушению питания) и влияющие на функционирование других клеток (на дифференциацию тканей глаз). Чтобы лучше познакомиться с генетическим контролем действия, оказываемого извне на клетки, в которых функционирует данный ген, рассмотрим две серии исследований, проведенных на мышах. В первой, которую осуществили Дж. Снелл, П. Смес и И. Мак Дауелл и Т. Френсис, проводилось сравнительное изучение нормальных и карликовых мышей. У карликовых мышей все части тела пропорционально уменьшены в результате наличия полностью рецессивного гена, находящегося в гомозиготном состоянии. На ранних стадиях эмбрионального развития нормальные и карликовые мыши растут с равной скоростью, но затем у карликовых мышей рост внезапно прекращается и они никогда не достигают половой зрелости. Микроскопическое изучение обнаружило, что у карликовых мышей передняя доля гипофиза значи-

коротконогим особям. Как уже упоминалось, у *SrSr* эмбрионов уменьшенные щелевидные глаза. Можно пересадить ранний зачаток глаза (имагинальный диск) нормального эмбриона в какое-либо другое место нормальному же эмбриону. В этом случае он разовьется в глаз точно такого же типа, что и у гомозигот *SrSr*. Если же зачаток глаза эмбриона *SrSr* пересадить нормальному эмбриону на обычное для глаза место, он разовьется в нормальный глаз. Можно, следовательно, заключить, что развитие ненормальных глаз *Sr* обусловлено не каким-то изменением компетентности их ткани, а скорее какими-то аномалиями в ее окружении. Можно допустить, что у гомозиготы *SrSr* зачаток глаза

коротконогим особям. Как уже упоминалось, у *SrSr* эмбрионов уменьшенные щелевидные глаза. Можно пересадить ранний зачаток глаза (имагинальный диск) нормального эмбриона в какое-либо другое место нормальному же эмбриону. В этом случае он разовьется в глаз точно такого же типа, что и у гомозигот *SrSr*. Если же зачаток глаза эмбриона *SrSr* пересадить нормальному эмбриону на обычное для глаза место, он разовьется в нормальный глаз. Можно, следовательно, заключить, что развитие ненормальных глаз *Sr* обусловлено не каким-то изменением компетентности их ткани, а скорее какими-то аномалиями в ее окружении. Можно допустить, что у гомозиготы *SrSr* зачаток глаза

В другой се...
ветт, были ис...
длинный хвост...
или Brachy). Г...
чается потомст...
говорит о том,
и рецессивен...
мышь должны...
развития пото...
хвостых мышей...
но 25% эмбрио...
вития начинае...
представляют...
положены зача...
ствует хорда. I...
у них не устан...
бают примерно

Рассмотрим...
тела столь ав...
зависит от пр...
окружающая в...
шение закладк...
неспособности...
цию мезодерми...
зованием куль...
ток хорды, вз...
причем мезоде...
ткани были в...
хряща и позво...
в хрящ и позво...
тых из молодых...
ных условиях...
хорды нормаль...
взаимоотноше...
дермы отвечает...
ка хорды.

Приведенн...
могут влиять...
вать его путем...
частей тела (ка...
(как в случае...
петентности ве...
нения могут

тельно меньше, чем у нормальных. Более того, в гипофизах карликовых мышей отсутствуют определенные крупные клетки, встречающиеся в норме. Очевидно, это именно те клетки, которые секретируют гормон роста. Тот факт, что здесь мы имеем дело с генетически обусловленной *гипофизарной карликовостью*, подтверждается следующим экспериментом. Берут двух карликовых мышей из одного помета в возрасте примерно 30 дней и одной из них ежедневно в течение месяца производят инъекции экстракта из гипофиза карликовой мыши (рис. 6—10, Б), тогда как другой таким же образом вводят экстракт из гипофиза нормальной мыши (рис. 6-10, А). Первая мышь так и остается карликовой, а вторая в период введения экстракта растет и становится практически нормальной. Здесь, таким образом, мы сталкиваемся с химическим посредником — гипофизарным гормоном, регулирующим общий рост, наличие которого определяется одной парой генов.

В другой серии опытов, которые провели Л. Дани, П. Чесслей и Д. Беннетт, были исследованы хвосты мышей. Нормальная мышь (+ +) имеет длинный хвост, в одной из мутантных линий хвост укорочен (*Brachyury* или *Brachy*). При скрещивании короткохвостых мышей между собой получается потомство в соотношении 2 (короткохвостые): 1 (нормальные). Это говорит о том, что ген *Brachy T* доминантен в отношении короткого хвоста и рецессивен в отношении летальности. Следовательно, короткохвостые мыши должны представлять собой *T+*. При изучении эмбрионального развития потомства, получаемого в результате скрещивания короткохвостых мышей между собой (*T+ × T+*), было обнаружено, что примерно 25% эмбрионов нормальны (+ +), у 50% эмбрионов на 11-й день развития начинается дегенерация хвоста (*T+*) и примерно 25% эмбрионов представляют собой уродов (*TT*, рис. 6—11), у которых неправильно расположены зачатки задних конечностей, искривлена нервная трубка и отсутствует хорда. Поскольку у особей *TT* недоразвита вся задняя часть тела, у них не устанавливается нормальная связь со стенкой матки и они погибают примерно на 10-й — 11-й день развития.

Рассмотрим далее особь *TT*, у которой сегменты (*сомиты*) задней части тела столь аномальны. Известно, что нормальное образование сомитов зависит от присутствия нормальной закладки хорды. При ее наличии окружающая нормальная мезодерма образует сомиты. По-видимому, нарушение закладки хряща и позвонков в сомитах у особей *TT* обусловлено неспособностью закладки хорды развиться в хорду и вызвать дифференциацию мезодермы. Это объяснение можно проверить рядом опытов с использованием культур тканей. Можно поместить в культуральную среду зачаток хорды, взятый от нормального эмбриона и окруженный мезодермой, причем мезодерму можно взять и от той же или от другой особи. Если все ткани были взяты от нормальных мышей, *in vitro* происходит развитие хряща и позвонков. Более того, мезодерма нормальных мышей развивается в хрящ и позвонки и в том случае, когда она окружает зачаток хорд, взятых из молодых эмбрионов *TT*. Однако мезодерма эмбрионов *TT* при сходных условиях не образует хряща и позвонков, если она окружает зачаток хорды нормальных эмбрионов. Мы должны сделать вывод, что нормальные взаимоотношения нарушены у эмбрионов *TT* из-за неспособности мезодермы отвечать на нормальный индуктивный стимул, исходящий из зачатка хорды.

Приведенные выше данные говорят о том, что генетические изменения могут влиять на развитие многоклеточных организмов или контролировать его путем изменения либо относительных скоростей роста различных частей тела (как в случае «коротконогих» кур), либо общей скорости роста (как в случае гипофизарной карликовости), не затрагивая при этом компетентности некоторых или всех измененных тканей. Генетические изменения могут также влиять на дифференциацию, изменяя компетентность

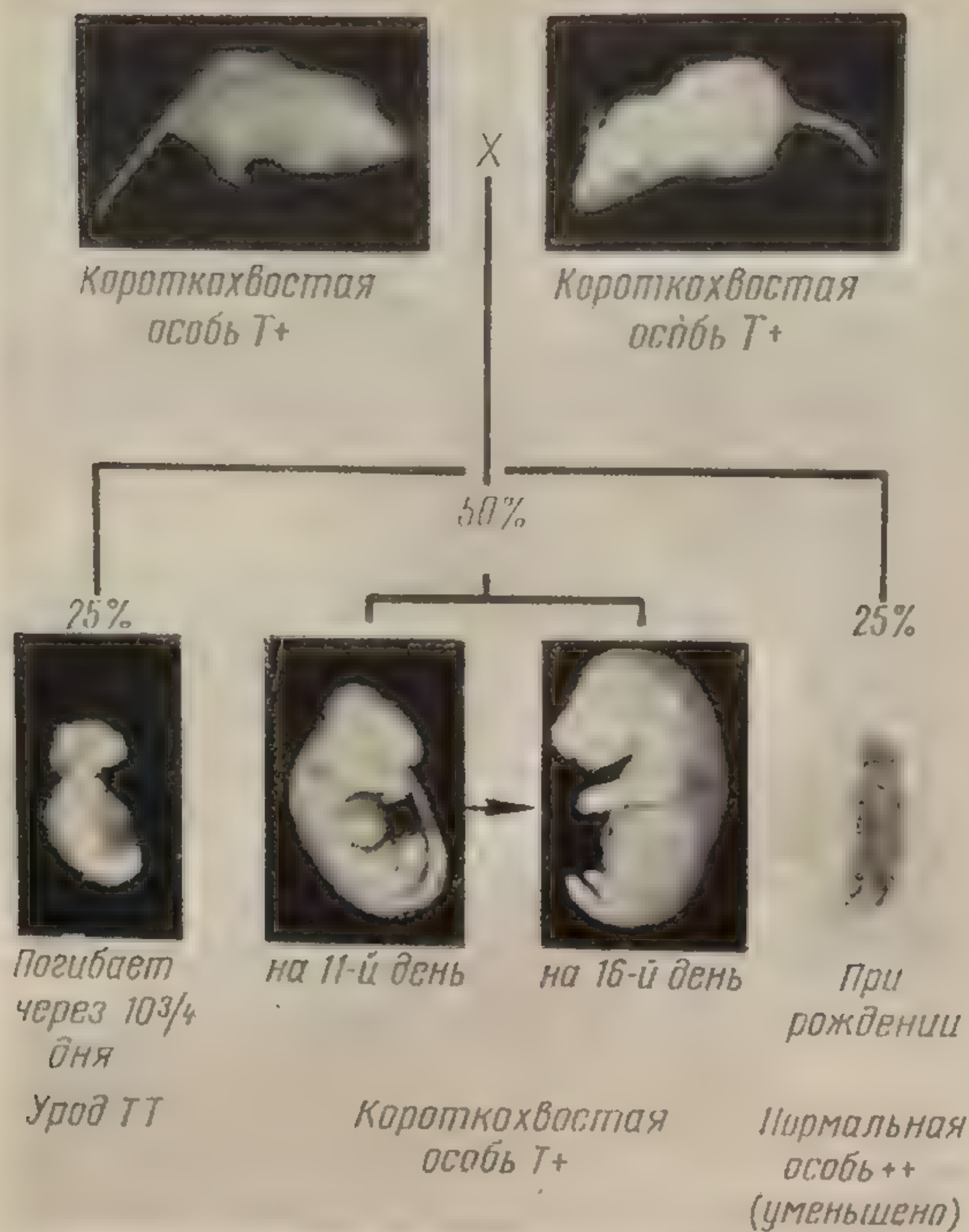


РИС. 6-11.

Короткохвостость домовый мыши

тканей (гомозиготные конечности Sp). Когда прилегающие друг к другу ткани взаимодействуют путем индукции, дифференциация может быть модифицирована генетически обусловленным изменением в компетентности ответа на действие индуцирующего агента (неспособность мезодермы TT отвечать на действие зачатка хорды) и, вероятно, так же за счет изменения способности вызывать индукцию. Следует, однако, иметь в виду, что, хотя в процессе развития и дифференциации высших многоклеточных организмов имеют место межклеточные взаимодействия всех перечисленных выше типов, некоторые клеточные признаки образуются просто в результате внутриклеточного действия генотипа. Именно так обстоит дело в тех случаях, когда мутация возникает во время эмбриогенеза и вызывает вредный или летальный эффект в клетках, содержащих мутантный ген.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разные аллели могут оказывать заметное влияние на жизнеспособность организма на любой стадии его жизненного цикла и могут видоизменять ожидаемые соотношения фенотипов, так что определенные типы потомков либо оказываются в избытке, либо встречаются с меньшей частотой, либо вовсе отсутствуют. Последний случай реализуется при действии доминантных, а также рецессивных летальных генов.

Ген обычно влияет на большое количество морфологических и биохимических признаков. Такой плеiotропный эффект является следствием иерархии причин, которую иногда удается проследить до одной единственной функции, осуществляемой непосредственно геном. Предполагается, что большинство генов (если не все гены) обладают только одним, вероятно биохимическим фенотипическим действием.

Пенетрантность и экспрессивность зависят как от генотипа, так и от среды. Для изучения трансмиссионной генетики удобнее всего использовать признаки со стопроцентной пенетрантностью, экспрессивность которых остается постоянной при колебаниях внешних условий, не выходящих за пределы нормы. Благодаря наличию у человека парных частей тела, а также существованию идентичных и неидентичных близнецов открывается возможность для изучения влияния генотипа и среды на пенетрантность и экспрессивность определенных фенотипических альтернатив.

Было показано, что значительное количество физических и умственных признаков определяются совместным действием как генотипа, так и среды, причем в разных случаях то один, то другой компонент оказывает большее влияние.

Описанный в этой главе метод анализа близнецов не выявляет трансмиссионных свойств изучаемых генотипов. Поэтому этот метод ничего не говорит ни о расположении, ни о числе, ни о рекомбинационных свойствах генов.

Используя морфологические признаки, можно изучать феногенетику, т. е. механизм проявления генетически обусловленных фенотипов. Обычно в феногенетике начинают с изучения генетики развития морфологических признаков, однако часто оказывается, что конечные морфологические последствия, обычно имеющие плеiotропный характер, обусловлены более ранними морфологическими изменениями, которым в свою очередь предшествуют еще более ранние физиологические изменения. Следовательно, генетика развития морфологических признаков обусловлена физиологическими изменениями, вызванными генотипом, что приводит к необходимости изучения физиологической генетики.

При изучении физиологической генетики выясняется, что физиологическое действие генотипа является в одних случаях внутриклеточным, а в других — межклеточным. Контролируемое генами действие одних клеток на другие может заключаться в общем или локальном контроле скорости роста и дифференциации. Этот контроль может осуществляться на малых расстояниях (индукция) или на больших расстояниях (влияние на снабжение питательными веществами, действие гормонов и, вероятно, нервные импульсы и мышечные сокращения). Изменения генов могут изменять компетентность тканей.

Для понимания физиологической генетики необходимо в свою очередь знать, как именно гены влияют на метаболизм, а поскольку метаболизм включает в себя физические и химические реакции, то феногенетика должна быть доведена до биофизического и биохимического уровня. Феногенетическое изучение гена, вызывающего серповидноклеточную анемию, шло от морфологии к физиологии и дальше к биохимии.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

- 6.1. Могут ли генетически отличающиеся индивидуумы обладать одинаковой жизнеспособностью? Поясните.
- 6.2. Почему на основании приведенных в этой книге данных нельзя сделать вывода, что гены, определяющие MN группы крови у человека или фенотип «бледно-зеленые» у львиного зева, плейотропны?
- 6.3. Как ген может оказаться летальным для генотипа, не вызывая гибели особи?
- 6.4. Скрещиваются две дрозофилы с закрученными вверх крыльями (*curly*) и укороченными щетинками (*stubble*). При проверке многочисленного потомства, получившегося в результате этого скрещивания, обнаружено соотношение 4 («закрученные», «укороченные»): 2 (только «закрученные»): 1 (не «закрученные» и не «укороченные», т. е. нормальные мухи дикого типа). Дайте генетическое объяснение этого результата.
- 6.5. У дрозофилы скрещивание ♂ *A* × ♀ *B* или ♂ *C* × ♀ *D* дает потомство F_1 , $\frac{1}{4}$ которого имеет коричневую окраску и погибает на стадии яйца. При скрещивании же ♂ *A* × ♀ *D* и ♂ *C* × ♀ *B* ни одно из яиц F_1 не становится коричневым и не гибнет. Как можно объяснить такой результат генетически?
- 6.6. В чем сходство и различия между *пенетрантностью* и *экспрессивностью*?
- 6.7. Какой ген плейотропен у дрозофилы: ген красных глаз или его аллель — ген белых глаз? Поясните.
- 6.8. Большинство изученных генов дрозофилы влияют на экзоскелет мухи. Можно ли предполагать, что эти же гены влияют и на внутренние органы?
- 6.9. Существуют ли индивидуумы, гомозиготные по признаку полидактилии? Каков должен быть их фенотип?
- 6.10. Почему гены со 100%-ной *пенетрантностью* и постоянной *экспрессивностью* лучше всего подходят для изучения свойств генов?
- 6.11. У ребенка на одной из рук имеется шесть пальцев, хотя оба его родителя нормальны. Чем это можно объяснить?
- 6.12. Определенный тип облысения определяется геном, доминантным у мужчин и рецессивным у женщин. Нормальный мужчина женится на лысой женщине и у них рождается лысый сын. Какой генотип всех членов этой семьи и какова *пенетрантность* генов?
- 6.13. У мужчины один глаз карий, а другой голубой. Объясните это явление.
- 6.14. Как можно решить, является ли данный фенотип следствием действия редкого доминантного гена с полной *пенетрантностью* или редкого рецессивного гена с низкой *пенетрантностью*?
- 6.15. Почему для выяснения вопроса, являются ли близнецы однояйцевыми или двуяйцевыми, необходимо изучать признаки, по которым гетерозиготны один или оба родителя?
- 6.16. Совершались ли ошибки при отнесении близнецов к типу двуяйцевых? Почему?
- 6.17. Можно ли считать ген *P*, определяющий полидактилию, частично доминантным? обладающим плейотропным действием? Поясните.
- 6.18. Почему один или оба родителя неидентичных близнецов, дискордантных по группе крови *ABO*, должны быть гетерозиготны по *I^A* или *I^B*?
- 6.19. Придумайте конкретный пример того, как у идентичных близнецов возникает большая дискордантность по сравнению с неидентичными близнецами.
- 6.20. Какова вероятность того, что два близнеца являются двуяйцевыми, если оба обладают генотипом *aaBbCcDdEeFf* (каждая пара генов рас-



РИЧАРД БЕНЕДИКТ
ГОЛЬДШМИДТ
(1878—1958)

щепляется независимо от других), а у родителей были генотипы $AaBbCCDD EeFf$ и $AaBBCCddeEFF$.

6.21. Как можно проверить, имеется ли у женщин генетическая обусловленность одновременного созревания нескольких яиц?

6.22. Как может генотип отца влиять на частоту рождения двоен?

6.23. Наследуется ли туберкулез? Поясните.

6.24. Какие сведения о генах дают результаты исследования близнецов? Какие сведения о генетической рекомбинации?

6.25. Можно ли выводы, полученные при изучении близнецов, распространять на неблизнецов?

6.26. Содержатся ли в этой главе какие-либо новые сведения о свойствах гена? Поясните.

6.27. Рассел обнаружил в генетически черной линии домовых мышей фенотип *Splochy* (грязные пятна), при котором на животе и изредка на спине располагаются белые пятна. Скрещивание пятнистых мышей с черными дает как черное, так и пятнистое потомство.

Скрещивание пятнистых мышей между собой дает те же типы потомства, но при этом некоторое количество эмбрионов гибнет *in utero* в возрасте 14 дней. Хвосты у этих эмбрионов закручены, а позвонки раздвоены (*spina bifida*). Какова генетическая основа этих результатов? Какие признаки доминантны, а какие рецессивны?

6.28. Было показано, что можно пересадить взрослым самкам мышей яичники, взятые от эмбрионов. Потом от этих мышей можно получить потомство. Как можно, используя эту возможность, определить генотип ненормальных эмбрионов, описанных в задаче 6.27?

6.29. Согласны ли вы с утверждением Дж. Х. Санджа о том, что пенетрантность (P) и экспрессивность (E) «...являются описательными терминами, прикрывающими наше незнание тех реакций, которые определяют конкретные значения P и E в разных случаях»? Поясните.

6.30. При скрещивании некоторых линий японского перепела (*Coturnix coturnix*), которые выглядят вполне нормальными, образуется некоторое количество эмбрионов с короткой широкой головой и выступающими из глазниц глазами; эти эмбрионы гибнут между 11-м и 16-м дня-

ми инкубации. Как можно выяснить, не являются ли эти ненормальные эмбрионы гомозиготами по одному рецессивному летальному гену?

6.31. Какие выводы можно сделать на основании данных, приведенных в работе Б. Харвалда и М. Хауджа (J. Amer. Med. Assoc., 1963, 186, 749—753), полученных при изучении двоен в Дании?

| Число исследованных пар | | Один близнец болен раком | Оба близнеца больны раком | |
|-------------------------|------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | | | затронут один и тот же орган | затронуты разные органы |
| Идентичные | 1528 | 143 | 8 | 13 |
| Неидентичные | 2609 | 292 | 9 | 39 |

6.32. Каким образом изучение генов помогает нам понять нормальное эмбриональное развитие?

6.33. Если все соматические клетки обладают одинаковым генотипом, то почему они не дифференцируются одинаковым образом?

6.34. Каким образом гены могут регулировать эмбриональное развитие?

6.35. Подтверждают ли исследования «коротконогих» кур, короткохвостых мышей и гипофизарной карликовости точку зрения, согласно которой большинство, если не все, гены обладают одним первичным действием?

6.36. Какая связь между фенотипикой, генетикой развития, физиологической генетикой и биохимической генетикой?

6.37. Какова относительная роль генов, действующих на более ранних и более поздних стадиях развития?

6.38. Считаете ли Вы, что все гены функционируют все время во всех клетках тела? Почему?

6.39. «В этой главе речь идет в основном о развитии, а не о генах». Согласны ли вы с этим утверждением? Почему?

6.40. Что можно узнать о действии генов, если у изучаемого гена имеется только две альтернативы? Много альтернатив?

ЛИТЕРАТУРА

- Th. Dobzhansky and A. M. Holtz. A Re-examination of manifold effects of genes in *Drosophila melanogaster*.— Genetics, 1943, 28, 295.
- R. B. Goldschmidt. Theoretical Genetics. Berkeley and Los Angeles, 1955.
- S. Gluecksohn-Waelsch. Physiological genetics of the mouse.— Advances in Genet., 1951, 4, 2—49.
- H. Grüneberg. The pathology of development. Oxford, 1963.
- E. Hadorn. Patterns of development and biochemical pleiotropy.— Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1956, 21, 363.
- E. Hadorn. Developmental genetics and lethal factors. N. Y., 1961.
- F. J. Kallman. Heredity in Health and Mental Disorder. N. Y., 1953.
- W. Landauer. On the chemical production of developmental abnormalities.— J. Cell Compar. Physiol., 1954, 43 (Suppl.), 261.
- A. Montagu. Human Heredity. Cleveland, 1959.
- H. H. Newman. Multiple Human Births. N. Y., 1940.
- F. Osborn. Preface to Eugenics. Rev. ed. N. Y., 1951.
- R. H. Osborn and F. V. De George. Genetic basis of morphological variation. Cambridge, 1959.
- J. H. Sang. Penetrance expressivity and thresholds.— J. Heredity, 1963, 54, 143.
- К. Уоддингтон. Морфогенез и генетика (Перев. с англ.). Изд. «Мир», 1964.
- S. Wright. The physiology of the gene.— Physiol. Rev., 1941, 41, 487.

Генетическую
признаку су
пол). Ее нел
тение бисексу
половым.1 ор
ческим разли
ческой приро
особь являетс

При скрещ
отношение ко
да можно про
один из поло
паре. Однако
но генотипу

В соответс
следует предп
Обозначим па
деляющим по
через ХУ. То
даст равное ко
положительно
ми, а остальные
melanogaster д
дую особь мо

ГЕНЫ, СЦЕПЛ

Рассмотрим р
аллели генов
и черного цвет
ное жилкован
 $ci^+ ci^+ e \times ci^+ ci^+$
ным рецессив
 $1:1:1:1$, ск
ся независимо
ся при скрещ
скрещивания
менно просле
наблюдается с
самок с прер
Следовательно
независимо от
гипотезой ci^+ -а

Точно так ж
дают соотноше
гена черного п
тела расщепля
в разных пар

7 И. Гершкович

ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ И СЦЕПЛЕННЫЕ С ПОЛОМ ГЕНЫ

Генетическую природу пола можно изучить благодаря тому, что по этому признаку существуют фенотипические альтернативы (мужской и женский пол). Ее нельзя выяснить при изучении садового гороха, так как это растение бисексуально, т. е. обладает одновременно и мужскими, и женскими половыми органами, в результате скрещивание не приводит к фенотипическим различиям по рассматриваемому признаку. Для изучения генетической природы пола можно использовать дрозофилу, у которой типичная особь является либо самкой, либо самцом (рис. 2—6, стр. 31).

При скрещивании нормальных самцов и самок в потомстве наблюдается отношение количеств фенотипов самцов и самок, равное примерно 1. Отсюда можно предположить, что пол определяется одной парой генов и что один из полов дрозофилы гетерозиготен, а другой гомозиготен по этой паре. Однако на основании этих данных еще нельзя сказать, какому именно генотипу соответствует тот или иной пол.

В соответствии с представлением о расположении генов в хромосомах следует предположить, что имеется одна пара хромосом, связанная с полом. Обозначим пару гомологичных хромосом, гомозиготных по генам, определяющим пол, через XX, а пару хромосом, гетерозиготную по этим генам, через XY. Тогда расщепление и случайное перекрестное оплодотворение даст равное количество XX и XY потомков. X-и Y-хромосомы, которые предположительно содержат гены пола, можно назвать *половыми хромосомами*, а остальные хромосомы — *аутосомами* (A). Поскольку у *Drosophila melanogaster* диплоидный набор хромосом состоит из четырех пар, то каждую особь можно обозначить либо как XX + 3AA, либо XY + 3AA.

ГЕНЫ, СЦЕПЛЕННЫЕ С ПОЛОМ

Рассмотрим результаты скрещиваний, в которых участвуют рецессивные аллели генов *прерванной кубитальной жилки* (*ci-cubitus interruptus*) и *черного цвета тела* (*e-ebony*) и их доминантных аллелей ci^+ (нормальное жилкование крыльев) и e^+ (серый цвет тела). В первом скрещивании $ci^+ ci^+ e^+ e^+ \times ci ci ee$ один из родителей является дигибридом, а другой — двойным рецессивом (табл. 7—1). Среди потомства наблюдается соотношение 1 : 1 : 1 : 1, свидетельствующее о том, что эти две пары генов расщепляются независимо друг от друга. Такой же результат и те же выводы получают при скрещивании $ci^+ ci ee \times ci ci e^+ e^+$. Рассмотрим теперь реципрокные скрещивания $ci^+ ci XX \times ci ci XY$ и $ci^+ ci XY \times ci ci XX$, в которых одновременно прослеживаются пол и жилкование крыльев. В обоих случаях наблюдается соотношение 1 : 1 : 1 : 1 для самцов с прерванной жилкой, самок с прерванной жилкой, нормальных самцов и нормальных самок. Следовательно, в этом случае гены, определяющие пол, расщепляются независимо от генов жилкования крыльев. Поэтому в соответствии с нашей гипотезой *ci*-аллели располагаются в аутосомах.

Точно так же реципрокные скрещивания $e^+ e^+ XX \times ee XY$ и $e^+ e^+ XY \times ee XX$ дают соотношения 1 : 1 : 1 : 1, что говорит об аутосомном расположении гена черного цвета тела. Поскольку гены жилкования и черной окраски тела расщепляются независимо друг от друга, они должны располагаться в разных парах аутосом.

Таблица 7—1

РЕЗУЛЬТАТЫ ВОЗВРАТНОГО СКРЕЩИВАНИЯ ДИГИБРИДА

| | | |
|----------------|--|--------------|
| P ₁ | $ci^+ci\ e^+e \times$ | $ci\ ci\ ee$ |
| G ₁ | $\frac{1}{4}ci^+e^+, \quad \frac{1}{4}ci^+e, \quad \frac{1}{4}ci\ e^+, \quad \frac{1}{4}ci\ e$ | $ci\ e$ |
| F ₁ | $\frac{1}{4}ci^+ci\ e^+e$ $\frac{1}{4}ci^+ci\ ee$ $\frac{1}{4}ci\ ci\ e^+e$ $\frac{1}{4}ci\ ci\ ee$ | |

Хотя мы пока еще не можем сказать, к какому полу относятся особи XX и XY, два последних скрещивания можно рассматривать как реципрокные возвратные скрещивания моногибридов, поскольку в одном случае гибридным родителем был самец, а в другом — самка. В обоих случаях фенотипические признаки появились в соотношении 1 : 1 как среди сыновей, так и среди дочерей.

Теперь мы можем заново рассмотреть ранее сделанное утверждение о том, что все реципрокные скрещивания дают одинаковые результаты. Это значит, что наблюдаемые фенотипы и их соотношения одинаковы как среди сыновей, так и среди дочерей, несмотря на то, что скрещивания проводятся реципрокно. Так, в скрещивании дигибридов $ci^+ci\ e^+e \times ci^+ci\ e^+e$ должно получиться соотношение 9 : 3 : 3 : 1 как среди сыновей, так и среди дочерей, так как гены, определяющие пол, располагаются в половых хромосомах, а остальные гены в этом случае располагаются в негомолотичных парах аутосом. До сих пор мы имели дело с рекомбинацией только аутосомных генов. Поскольку аутосомные гены всегда расщепляются независимо от генов, определяющих пол, то пол не влияет на результаты скрещиваний. Это значит, что при аутосомном скрещивании у сыновей и дочерей получаются одинаковые фенотипические результаты, хотя скрещивания проводятся реципрокно.

Рассмотрим результаты скрещивания, в котором участвуют аллели красных (w^+) и белых (w) глаз. При использовании чистых линий скрещивание красноглазых ♀ с белоглазыми ♂ (рис. 7—1, А) дает в F₁ сыновей и дочерей с красными глазами, что и следовало ожидать, так как w^+ доминантен. Однако при реципрокном скрещивании (рис. 7—1, Б) белоглазых ♀ и красноглазых ♂ у всех потомков мужского пола глаза оказываются белыми, а у всех потомков женского пола — красными. Итак, первое скрещивание дало одинаковые результаты для сыновей и дочерей, тогда как второе (реципрокное) скрещивание дало различные результаты: сыновья оказались похожими на матерей, а дочери на отцов. Поскольку такие результаты никогда не получались в реципрокных скрещиваниях по аутосомным генам, мы можем заключить, что w^+ и его аллели располагаются не в аутосомах.

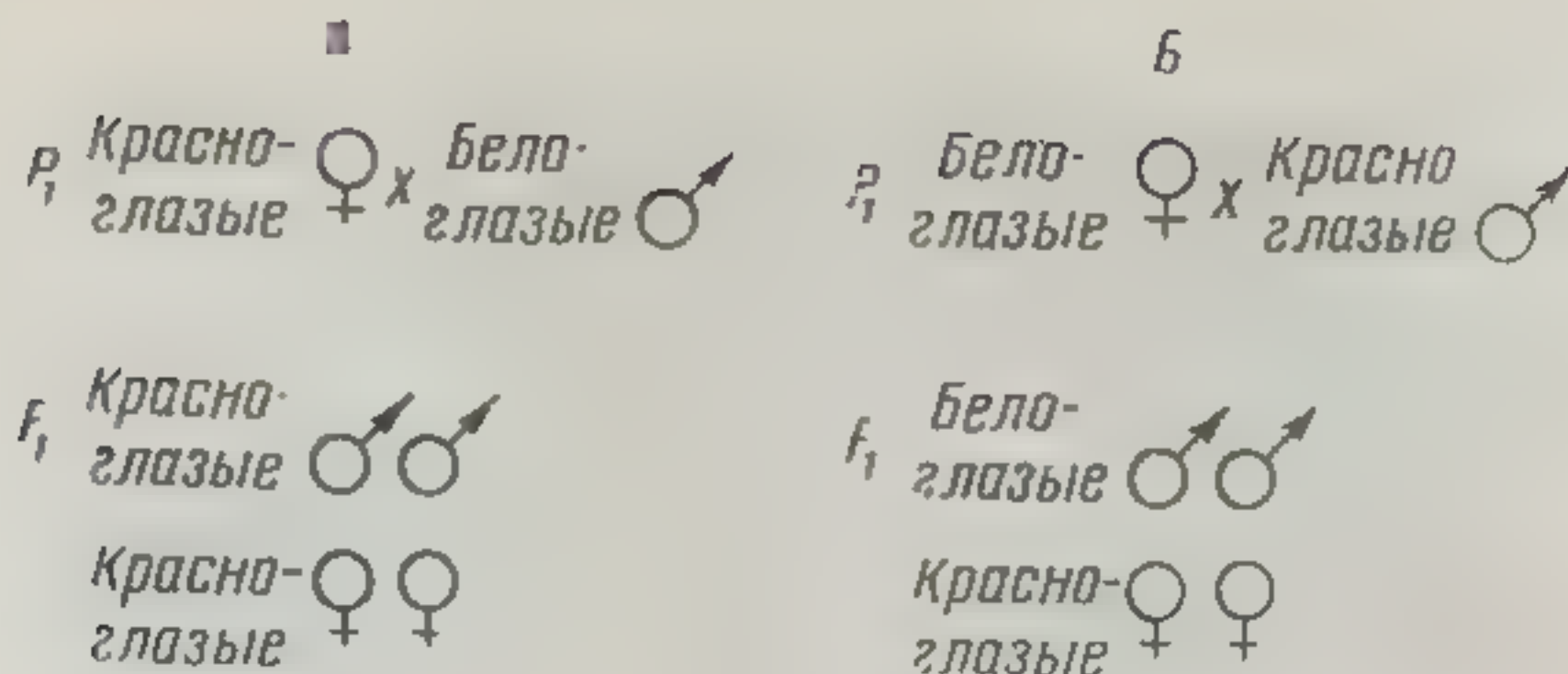
Допустим, что ген белых глаз расположен в половой хромосоме, иначе говоря, сцеплен с полом, и посмотрим, как это отразится на его передаче потомству, проследив одновременно за характером пола (Т. Morgan, 1910).

Если допустить, что самки представляют собой XY, а самцы XX, то первое скрещивание следует записать так: (самка с красными глазами $X^{w^+}Y^{w^+}$) \times (самец с белыми глазами, X^wX^w) (рис. 7—2, А-1) и в F₁ нужно ожидать появления сыновей $X^{w^+}X^w$ и дочерей $X^{w^+}Y^w$ с красными глазами, что и наблюдается в действительности. Реципрокное скрещивание (рис. 7—2, Б-1), следовательно, можно представить так: (белоглазые ♀ X^wY^w) \times (красноглазые ♂ $X^{w^+}X^w$). Следует ожидать, что в F₁ у дочери ($X^{w^+}Y^w$) будут красные глаза, что действительно и имеет место. Можно ожидать

рис. 7-1.

Фенотип потомства реципрокных скрещиваний красноглазых и белоглазых мух

♂♂ — самцы; ♀♀ — самки



также, что и у сыновей в F_1 ($X^{w+}X^w$) глаза будут красными, тогда как на самом деле они оказываются белыми. Следовательно, мы должны отбросить данную гипотезу, связывающую именно таким образом половые хромосомы с генами цвета глаз.

Допустим противоположный вариант, — а именно, что самки представляют собой XX , а самцы XY . Тогда те же скрещивания нужно записать так: ♀ $X^{w+}X^{w+}$ (красноглазые) × ♂ X^wY^w (белоглазые), а потомство $X^{w+}X^w$ (дочери с красными глазами) и $X^{w+}Y^w$ (сыновья с красными глазами) (рис. 7—2, А-2); реципрокное скрещивание ♀ X^wX^w (белоглазые) × ♂ $X^{w+}Y^{w+}$ (красноглазые) дает потомство $X^{w+}X^w$ (дочери с красными глазами) и X^wY^{w+} (сыновья с красными глазами) (рис. 7—2, Б-2). И опять наши предсказания фенотипов потомства не подтверждаются на опыте: в действительности F_1 сыновья обладают белыми, а не красными глазами.

Поскольку нам не удастся объяснить полученные результаты простой идентификацией самцов в качестве XX или XY , необходимо увеличить число предположений. Поэтому проверим сразу две гипотезы: во-первых, допустим, что самцы дрозофилы представляют собой XY и, во-вторых, что Y -хромосома не может нести никаких других аллелей, кроме w . При этих предположениях результаты первого скрещивания, описанного в предыдущем абзаце, не изменяются (рис. 7—2, А-3). Реципрокное скрещивание (рис. 7—2, Б-3) записывается теперь в виде ♀ X^wX^w (белоглазая) × ♂ $X^{w+}Y^w$ (красноглазый) и дает дочерей с красными глазами $X^{w+}X^w$ и сыновей X^wY^w с белыми глазами. Так как эта гипотеза согласуется с наблюдениями, мы можем считать ее правильной.

Кроме признака цвета глаз и пола у дрозофилы имеется много других признаков, каждый из которых обусловлен парой генов, расположенных в половой хромосоме. Во всех случаях при использовании чистых линий для реципрокных скрещиваний в F_1 получаются разные результаты. Более того, все эти случаи можно объяснить, предположив, что самки представляют собой XX , а самцы XY и что Y несет наиболее рецессивный и наименее эффективный аллель из известных для каждой данной генной пары, как, например, w в случае окраски глаз. Тот факт, что в Y -хромосоме никогда не обнаруживается частично или полностью доминантных аллелей, должен означать, что такие аллели не могут возникнуть из наиболее рецессивного аллеля в результате мутации просто потому, что этот рецессивный аллель отсутствует в Y . Соответственно, в Y -хромосоме обычно нет аллелей генов, расположенных в X -хромосоме, и на рис. 7—2 (А-3 и Б-3) все Y^w нужно заменить на Y .

Во всех случаях, когда в Y не содержится аллеля гена, имеющегося с X -хромосоме, у самцов будет проявляться любой из аллелей, расположенных в той единственной X -хромосоме, которую сыновья получают от матери. Поэтому по таким генам самку дрозофилы можно проверить, скрестив ее с каким угодно самцом, так как о ее генотипе можно прямо судить по фенотипу ее сыновей. Особь, несущая один или несколько неспаренных генов, но диплоидная по остальным генам, называется *гемизиготой*. Например, у самцов дрозофилы гемизиготны гены, имеющиеся в X -хромосоме,

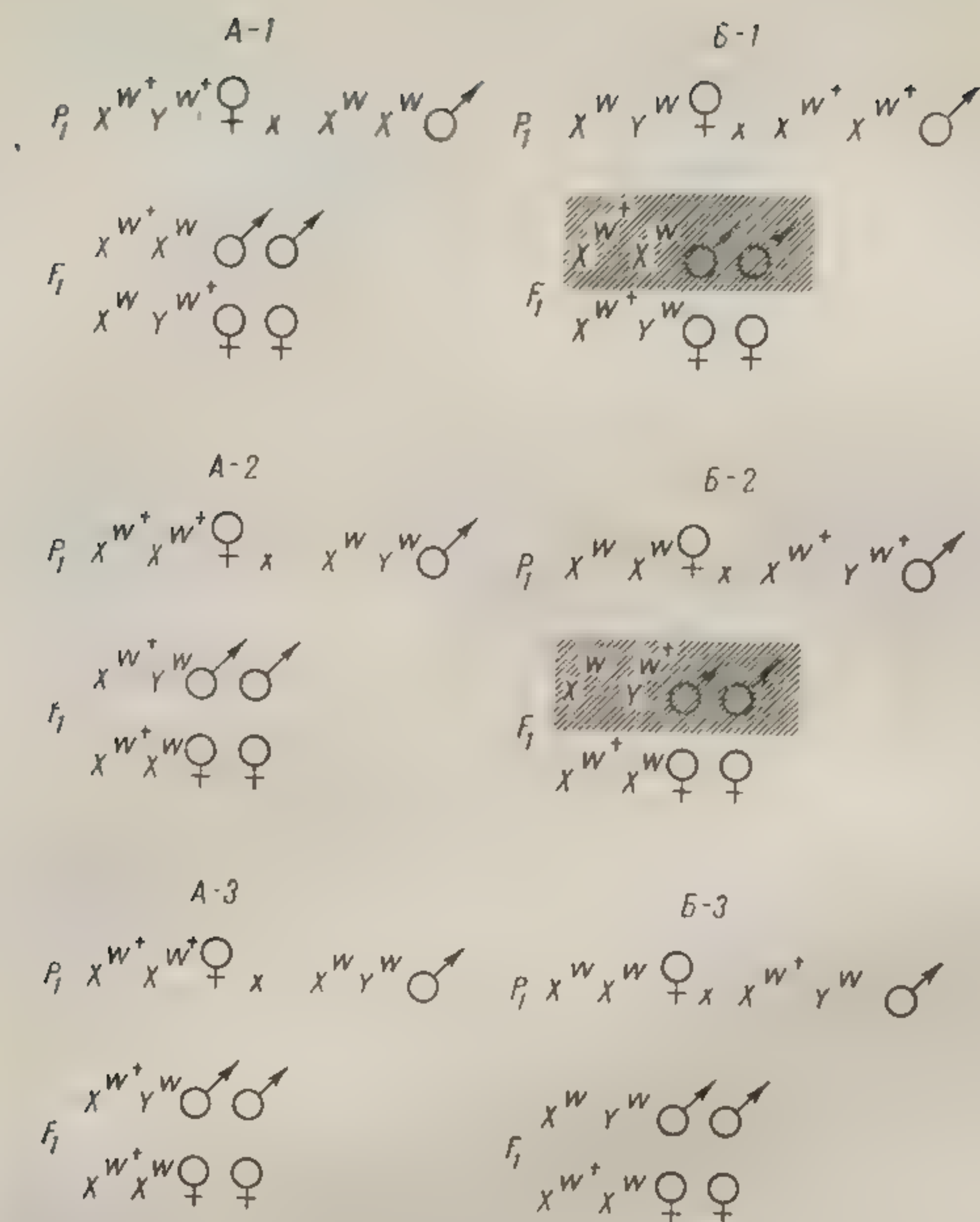


рис. 7-2.

Три попытки (А-1 и Б-1, А-2, Б-2 и А-3 и Б-3) представить генотипы участников скрещивания $A \times B$, изображенного на рис. 7-1.

Генотипы, заключенные в прямоугольники, не соответствуют экспериментальным результатам

но отсутствующие в Y . Половина образованных ими гамет получит эти аллели вместе с X -хромосомой, а другая половина, получившая Y -хромосому, не будет содержать этих аллелей. X -хромосома самца дрозофилы получена им от матери и передается всем дочерям, Y -хромосома передается от отца к сыну.

Скрещивание кур со сплошной окраской пера с петухами породы плимутрок со сплошной полосатой окраской пера дает потомство с окраской плимутрок, т. е. *полосатая* окраска пера (B — barred) доминирует над *сплошной* (b) (рис. 7-3, А). При реципрокном скрещивании (рис. 7-3, Б) (♀ полосатой окраски) \times (♂ сплошной окраски) все сыновья имеют окраску плимутрок, а все дочери — обычную. Итак, результаты реципрокных скрещиваний снова отличаются, так что и в этом случае мы имеем дело со сцепленным с полом наследованием. Здесь, как и в случае дрозофилы, у определенных класса потомства F_1 проявляется рецессивный признак. Но у дрозофилы и у кур рецессивный признак проявляется у особей противоположного пола, так как у кур сплошной окраской обладают дочери, а у дрозофилы белоглазыми являются сыновья. Для объяснения этого результата необходимо предположить, что пол у кур, как и у дрозофилы, определяется парами хромосом XX и XY и что в X -хромосоме имеется ген пестрой окраски, а в Y -хромосоме его нет. Однако в отличие от дрозофилы у кур самцы представляют собой XX , а самки XY .

В соответствии с этим следует писать следующие: окраской плимутрок (с окраской плимутрок) \times и $X^W X^W$ (♂ с окраской). Существующие наблюдениями, что в содержании и у кур, должны быть типов половых сцепления с пожеланий.

У дрозофилы хромосом, вид соответствующий очень похожи друг на друга, так как из хромосом этой пары, другая хромосома, цитологическая с основным представлена в Гомолог этой пары у самок он представляет цитологическая со своими гомологами в этой паре окраски пары похожи на окраску от них.

У моли, бабочки представляют со

P_1
 F_1
Окраска плимутрок

P_1

F_1

рис. 7-3.
Фенотипы скрещиваний

В соответствии с этой гипотезой описанные скрещивания кур можно записать следующим образом: X^bY (♀ не пестрой окраски) \times X^BX^B (♂ с окраской плимутрок), а F_1 потомство $\frac{1}{2} X^BY$ (с окраской плимутрок) и $\frac{1}{2} X^BX^B$ (с окраской плимутрок). Реципрокное же скрещивание X^BY (♀ с окраской плимутрок) \times X^bX^b (♂ не пестрой окраской) дает в F_1 X^bY (не пестрая ♀) и X^BX^b (♂ с окраской плимутрок) (рис. 7—3, А-1 и Б-1).

Существование половых хромосом подтверждается цитологическими наблюдениями. Действительно, можно ожидать, что столь большое различие в содержании генов в X- и Y-хромосомах, наблюдаемое у дрозофилы и у кур, должно найти свое отражение и в цитологической картине двух типов половых хромосом. Заметим, однако, что все предыдущее объяснение сцепления с полом было дано независимо от цитологических предположений.

У дрозофилы цитологически было обнаружено, что три из четырех пар хромосом, видимых в митотической метафазе у самок, не отличаются от соответствующих пар хромосом самца, причем гомологичные хромосомы очень похожи друг на друга (рис. 7—4). У самок гомологи, образующие четвертую пару, также морфологически сходны. Однако у самцов только одна из хромосом этой пары выглядит так же, как гомологичная ей хромосома самки, другая же заметно отличается от нее морфологически. Таким образом, цитологические особенности этой последней хромосомы согласуются с основанным на данных генетики предположением, что Y-хромосома представлена в единственном числе у самцов и вовсе отсутствует у самок. Гомолог этой хромосомы можно следовательно назвать X-хромосомой; у самок он представлен в двойном числе. У кур наблюдается обратная цитологическая картина: у самцов все хромосомы морфологически сходны со своими гомологами, тогда как у самок одна пара гетероморфна: гомологи в этой паре отличаются друг от друга морфологически: один из участников пары похож на соответствующие хромосомы самца, а другой отличается от них.

У моли, бабочек и некоторых амфибий и рептилий самцы, как и у птиц, представляют собой XX, а самки XY. Генетические и цитологические дан-

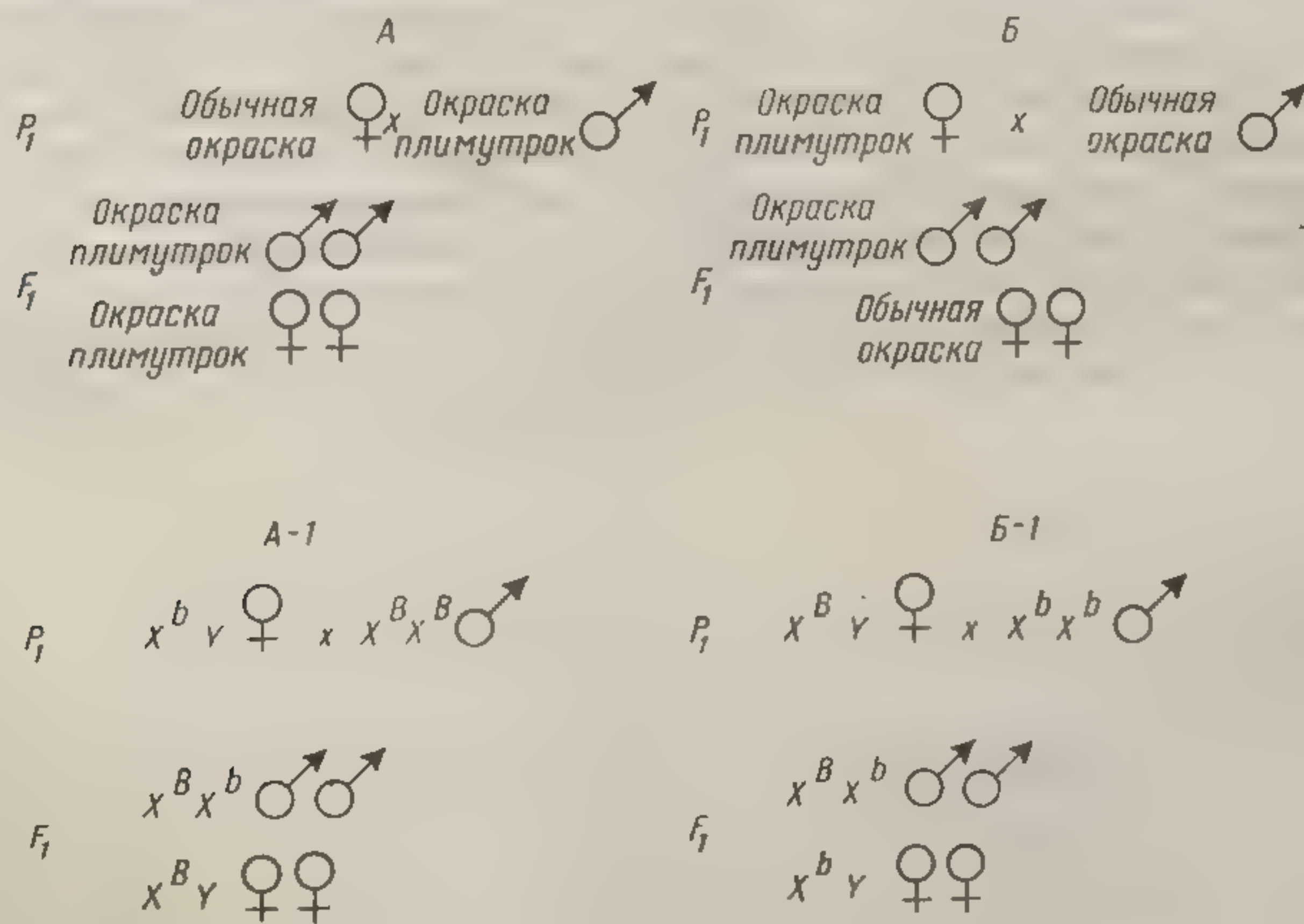


РИС. 7-3.

Фенотипы (А и Б) и генотипы (А-1 и Б-1) потомства реципрокных скрещиваний кур со сплошной окраской и окраской плимутрок

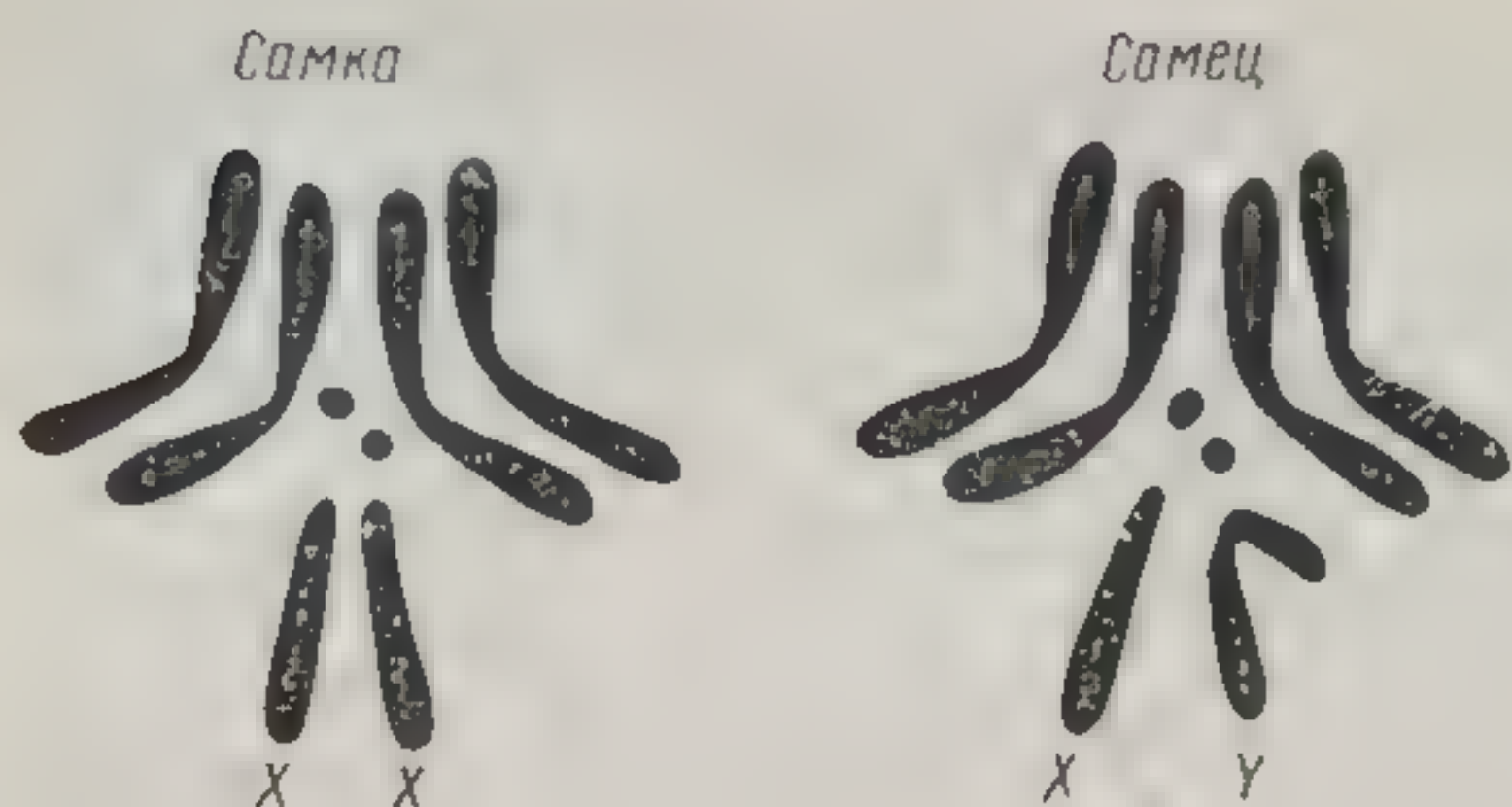


РИС. 7-4.

Форма хромосом *Drosophila melanogaster* во время метафазы митоза

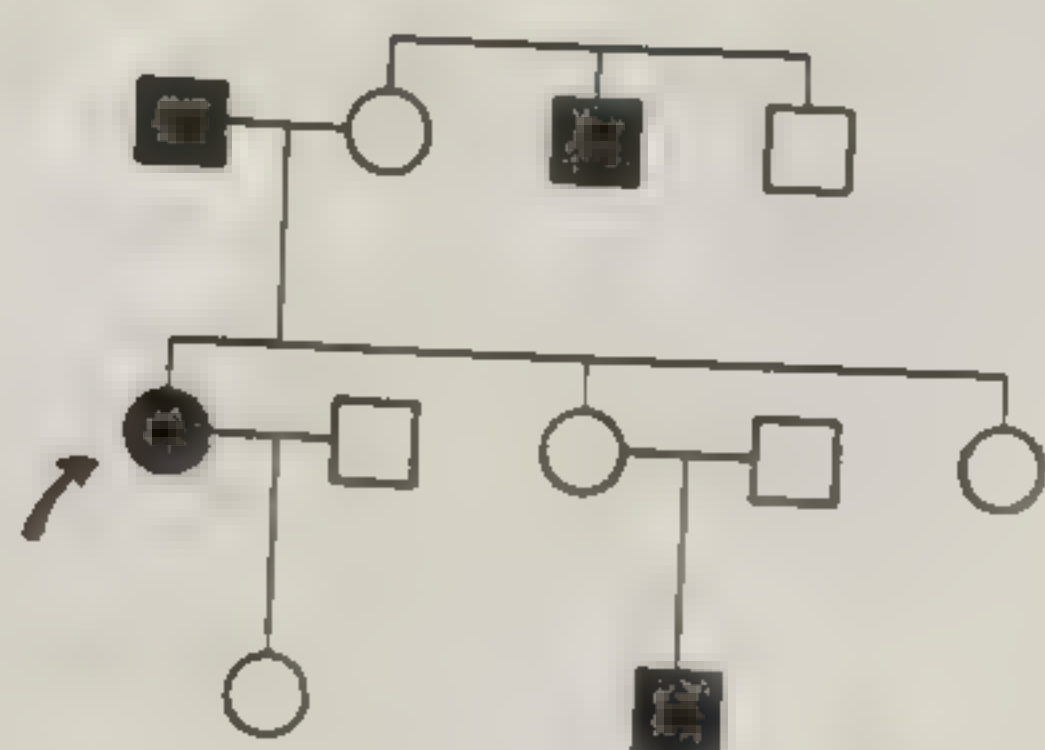


РИС. 7-5.

Родословная, в которой имеется женщина, гомозиготная по гену гемофилии

ные свидетельствуют о том, что у человека, как и у дрозофилы, мужской пол определяется парой XY, а женский — парой XX. Таким образом, у разных видов два типа гамет образуют особи разного пола. Иными словами, в отношении половых хромосом гетерогаметен лишь один пол, у разных видов разный.

У человека определенный тип красно-зеленой слепоты обусловлен рецессивным аллелем *s*, сцепленным с полом. Этот аллель имеется в X и отсутствует в Y-хромосоме. Соответственно, женщина с цветовой слепотой X^sX^s , вышедшая замуж за нормального мужчину $X^S Y$, будет иметь нормальных дочерей $X^S X^s$ и сыновей с цветовой слепотой $X^s Y$. У человека одна из болезней системы свертывания крови — гемофилия типа A обусловлена рецессивным геном *h*, также сцепленным с X-хромосомой и отсутствующим в Y. Это редкое заболевание обычно встречается у мужчин, однако недавно в Англии было обнаружено несколько женщин, страдающих гемофилией. Такие гомозиготы встречаются чрезвычайно редко, поскольку они могут возникнуть только от отца, страдающего гемофилией ($X^h Y$) и гетерозиготной матери ($X^H X^h$) (рис. 7—5).

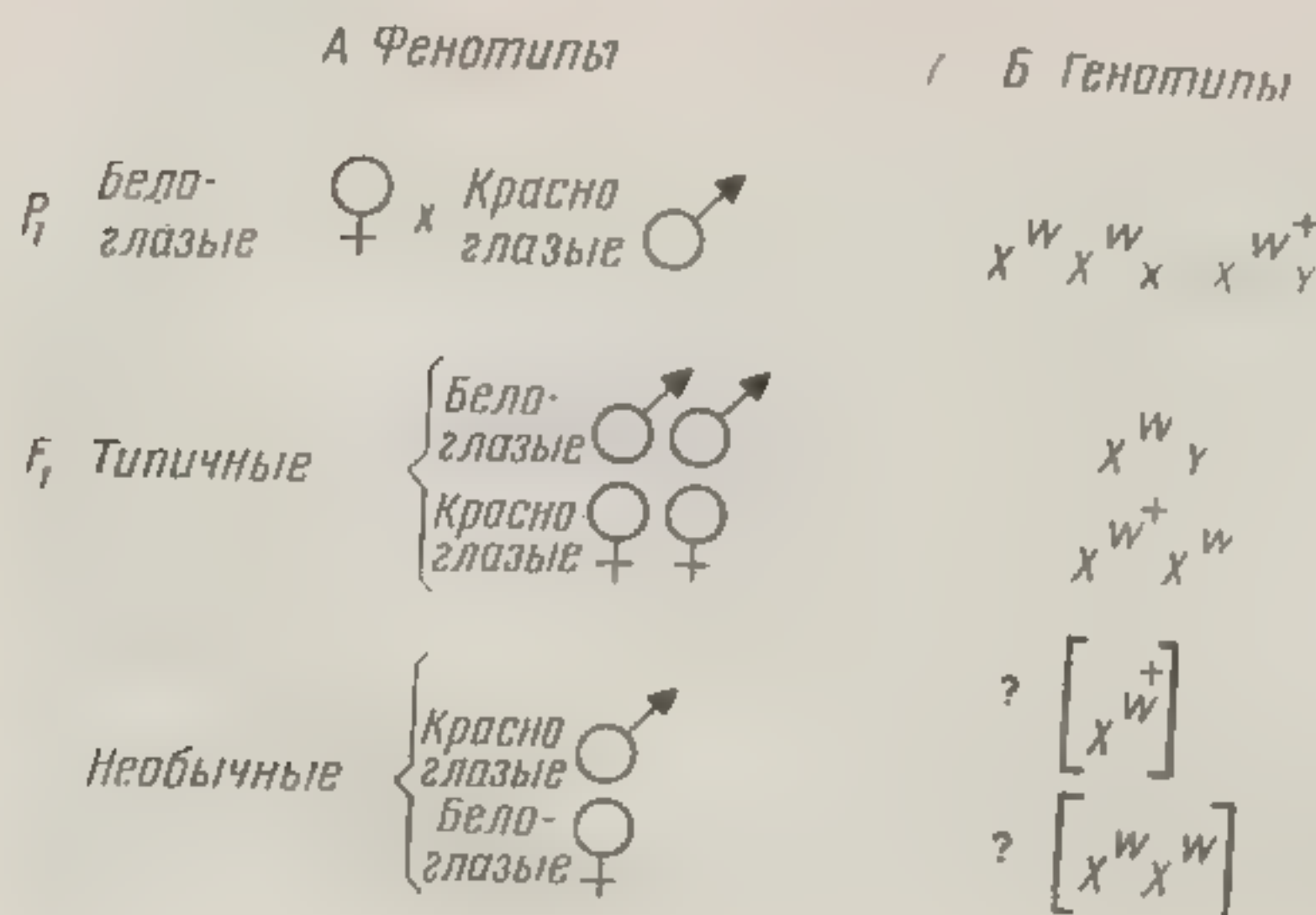


РИС. 7-6.

Необычные потомки-мутанты дрозофилы, полученные при скрещивании мух, отличающихся по цвету глаз

НЕРАСХОЖДЕНИЕ

Рассмотрим еще некоторые эксперименты, которые провел К. Бриджес с геном белых глаз дрозофилы, сцепленным с полом. Если изучить достаточно большое количество потомков, полученных от скрещивания белоглазых самок X^wX^w с красноглазыми самцами $X^{w+}Y$, то не у всех самцов в F_1 глаза оказываются белыми и не у всех самок красными. Одна или две мухи на сотню F_1 оказываются либо самцом с красными глазами, либо самкой с белыми глазами (рис. 7—6). Появление этих исключительных мух нельзя объяснить ошибками при просмотре фенотипов или загрязнением за счет посторонних мух. Более того, их появление нельзя объяснить и возникновением мутаций, поскольку частота мутирования w^+ в w и обратно на несколько порядков ниже частоты, с которой встречаются оба типа необычных мух.

Поскольку у нетипичных F_1 -самок глаза белого цвета, они должны иметь X^wX^w (рис. 7—6, Б). X-хромосомы, содержащие w , они могли получить только от матери. Соответственно, отец не должен был передать своим нетипичным дочерям X^{w+} -хромосому. Нетипичные сыновья с красными глазами должны содержать X^{w+} , которую они могли получить только от отца.

Для того чтобы понять, как может возникнуть такая необычная ситуация, рассмотрим, что происходит в норме с половыми хромосомами при мейозе у самок дрозофилы. Обычно две X-хромосомы конъюгируют и образуют тетраду. В конце мейоза в результате расщепления образуются четыре ядра, каждое из которых содержит по одной X-хромосоме (рис. 7—7, А). Затем одно из четырех ядер становится ядром гаметы, а три остальные попадают в полярные тельца.

Допустим, однако, что иногда не происходит нормального разделения нитей X-хромосом в тетраде. Это может случиться следующим образом.

1. В анафазе I, вместо того чтобы идти к разным полюсам, обе диады могут пойти к одному полюсу (рис. 7—7, Б). Ядро, не содержащее диады X-хромосом, после второго деления мейоза образует два ядра без X-хромосом. Другое ядро с двумя диадами X-хромосом осуществит второе деление мейоза, во время которого участники каждой диады разделятся, а в анафазе II разойдутся к противоположным полюсам. В результате получится два дочерних ядра, в каждом из которых содержится две X-хромосомы, по одной из каждой диады. Следовательно, в конце мейоза в результате неразделения диад в анафазе I образуется четыре ядра, два из которых совсем не содержат X-хромосом, а два содержат по две X-хромосомы. Таким образом, вероятность того, что ядро, которое станет ядром гаметы, не будет содержать X-хромосомы, равняется 50% и вероятность того, что оно будет содержать две X-хромосомы, также равна 50%.

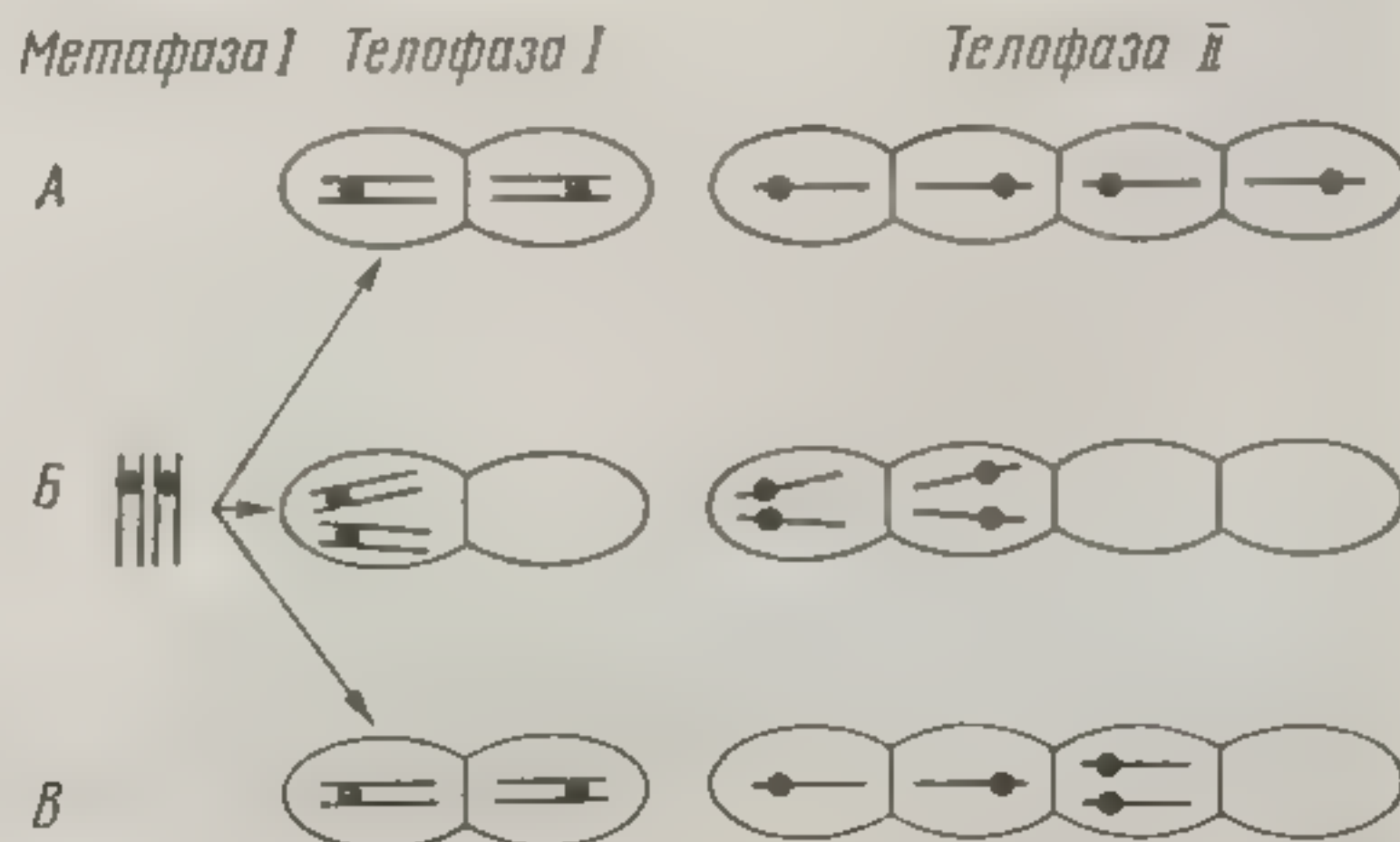


РИС. 7-7.

Последствия нормального расщепления X-хромосом (А) и их нерасхождения (Б и В)



КАЛЬВИН БЛЭКМАН
БРИДЖЕС
(1889—1938)

2. В другом случае (рис. 7—7, В) анафаза I протекает нормально, так что в телофазе I обнаруживаются два ядра, каждое из которых содержит по одной диаде X-хромосом. В одном из этих ядер второе деление мейоза протекает нормально и в телофазе II образуется два ядра, каждое из которых содержит по одной X-хромосоме. Однако во втором ядре в анафазе II диада X-хромосом не делится и в телофазе II оказывается в одном ядре. В результате этой неспособности монад разделиться в анафазе II, образуется два ядра, одно из которых не содержит X-хромосомы, а другое содержит две X-хромосомы. В результате всех этих событий ядро гаметы с вероятностью 25% не будет содержать X-хромосомы, с вероятностью 25% будет содержать две X-хромосомы и с вероятностью 50% будет содержать одну X-хромосому.

Итак, мы видим, что нерасщепление хроматид как в первом, так и во втором делении мейоза приводит к образованию некоторого количества яиц либо без X-хромосомы, либо с двумя X-хромосомами. Случай, когда не происходит расщепления хромосом, называется *нерасхождением* хромосом. По нашей гипотезе X-хромосома несет аллель w . Поэтому нерасхождение хромосом приводит к нерасщеплению генов, так что после мейоза образуются гаметы, содержащие либо оба гена пары, либо ни одного из них. Любая яйцеклетка, образовавшаяся после нерасхождения хромосом, как правило, будет оплодотворена спермием, который наряду с гаплоидным набором аутосом содержит либо X-, либо Y-хромосому. Нерасхождение хромосом может произойти во время мейоза также и у самца. Однако в данном случае мы можем пренебречь этой возможностью, поскольку нерасхождение происходит редко и вероятность того, что яйцеклетка, образовавшаяся после нерасхождения хромосом, будет оплодотворена спермием, также образовавшимся после нерасхождения хромосом, ничтожно мала.

Если гипотеза о нерасхождении хромосом верна, то она должна находиться в соответствии с генетическими данными. В необычной яйцеклетке белоглазой самки ($X^w X^w$), образовавшейся после нерасхождения, должен быть хромосомный набор либо $X^w X^w$, либо 0 (ноль означает отсутствие

хромосомы, которая
материнский сперматозоид
либо X^w, либо Y
случайного сего

Отвлечемся на
проводить их только
у типа 2 — белые
жен быть у типа 4
удается объяснить
представляет собой
ния, что XX явля
типы 1 и 4 не буд
Для доказательства
показать, что все
нормального для с
ную Y-хромосому
нормальных ауто
При цитологическ
ных самок и само
оправдались. Кро
у особей $X^{w+} X^w X^w$
достигнув зрелост

В то время как
ния мухи XO пред
плодовитости сам
писать гену, прис
Заметим, что нео
определения сам
самок, которые мо

ХРОМОСОМЫ КАК Г

Теперь мы можем е
сомы представляю
главах были описан
нов и хромосом: и т
и те и другие самор
во всех клетках дип
вым путем, за исклю
каждом митозе и сох
расщепляется при об
решными, но потом св
ренин; и у тех и у д
пар. Кроме того,

хромосомы, которая в норме должна присутствовать в яйцеклетке). Нормальный спермий самца с красными глазами ($X^{w+}Y$) должен содержать либо X^{w+} , либо Y . Ожидаемые генотипы F_1 , возникающие в результате случайного оплодотворения этих гамет, изображены ниже:

| яйцеклетки | спермии | потомство |
|------------|----------|----------------------|
| $X^W X^W$ | X^{w+} | (1) $X^{w+} X^W X^W$ |
| $X^W X^W$ | Y | (2) $X^W X^W Y$ |
| 0 | X^{w+} | (3) $X^{w+} 0$ |
| 0 | Y | (4) $Y 0$ |

Отвлечемся на время от пола нетипичных потомков и будем классифицировать их только по цвету глаз. У типа 1 должны быть красные глаза; у типа 2 — белые глаза, у типа 3 — красные глаза; какой цвет глаз должен быть у типа 4, сказать нельзя. Результаты генетических наблюдений удастся объяснить, если предположить, что типы 1 и 4 летальны, тип 2 представляет собой самок, а тип 3 — самцов. (Исходя из того представления, что XX является самкой, а XY — самцом, естественно ожидать, что типы 1 и 4 не будут ни тем, ни другим, а следовательно будут летальны). Для доказательства этих предположений необходимо еще цитологически показать, что все необычные самки представляют собой XXY , т. е. кроме нормального для самок диплоидного набора хромосом они имеют еще лишнюю Y -хромосому. Более того, каждый необычный самец должен, кроме нормальных аутосом, иметь одну X -хромосому и не иметь Y -хромосомы. При цитологическом изучении соматических диплоидных клеток необычных самок и самцов было обнаружено, что все эти предсказания полностью оправдались. Кроме того, можно показать, что зиготы $Y0$ летальны и что у особей $X^{w+}X^wX^w$ глаза красного цвета, но они обычно погибают, не достигнув зрелости.

В то время как XY являются плодовитыми самцами, все без исключения мухи $X0$ представляют собой стерильных самцов. Это значит, что для плодовитости самцов необходима Y -хромосома: этот признак можно приписать гену, присутствующему в Y -хромосоме, но отсутствующему в X . Заметим, что необходимо модифицировать хромосомные формулы для определения самцов, которые могут быть и XY и $X0$, и для определения самок, которые могут быть XX и XXY .

ХРОМОСОМЫ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Теперь мы можем еще раз рассмотреть гипотезу, согласно которой хромосомы представляют собой материальную основу генов. В предыдущих главах были описаны следующие черты сходства свойств и поведения генов и хромосом: и те и другие возникают от предсуществующих структур; и те и другие самореплицируются; и те и другие встречаются в виде пар во всех клетках диплоидной стадии организмов, размножающихся половым путем, за исключением гамет; и те и другие реплицируются при каждом митозе и сохраняют при этом свою индивидуальность; и те и другие способны мутировать, а затем удваиваться в новой форме; и те и другие расщепляются при образовании гамет, в которых они перестают быть спаренными, но потом снова объединяются случайным образом при оплодотворении; и у тех и у других наблюдается независимое расщепление разных пар. Кроме того, было сделано предположение, что хромосомы больше

рекомбинационного гена (рекомбинационный ген — наименьшая рекомбинирующая единица генетического материала), так как ген был определен как наибольшее расстояние на хромосоме, внутри которого не может произойти обмен, приводящий к хиазме.

Можно, тем не менее, считать, что все эти параллели имеют случайный характер. В настоящей главе приводятся дополнительные данные, которые позволяют проверить предположение, согласно которому хромосомы являются материальными носителями генов.

Сцепление с полом, обнаруженное благодаря закономерной связи между передачей пола и передачей некоторых генов, является исключением по сравнению с характером передачи до сих пор рассматриваемых аутосомных генов. Это явление удалось объяснить, предположив, что определенные гены не имеют соответствующих аллелей в гомологичной хромосоме в особях одного пола, но имеют их в особях другого пола. Оказалось необходимым предположить, что такой *гемизиготностью* отличаются самцы дрозофилы и самки кур. Это нарушение в генном составе полностью коррелировало с наличием пары гетероморфных хромосом у самцов дрозофилы и у самок кур, один из участников которой имеется в двойном числе у самок дрозофилы и у самцов кур.

II, наконец, у дрозофилы было обнаружено исключение из исключения — нарушение сцепления с полом, которое генетически можно объяснить тем, что рассматриваемой паре сцепленных с полом генов не удалось расщепиться. В результате этого образуются гаметы, либо содержащие два, либо не содержащие ни одного аллеля данного сцепленного с полом гена. Такое *нерасхождение генов* было объяснено *нерасхождением хромосом*, т. е. нерасхождением при мейозе пары X-хромосом. Можно предсказать, что при нерасхождении хромосом генетически необычные особи должны содержать необычный хромосомный набор, что и было подтверждено в дальнейшем.

В свете этих данных представление о том, что хромосомы являются материальными носителями всех до сих пор рассмотренных генов уже нельзя считать лишь гипотезой, основанной на ограниченном числе фактов и потому возможно случайных. Эту гипотезу теперь нужно принять в качестве теории, которая подтверждается как типичными, так и атипичными рекомбинационными свойствами генов и хромосом.

В последующих главах, как правило, не будут комментироваться те случаи, когда новые опыты и наблюдения будут подтверждать эту теорию, и поэтому читатель может считать, что все опыты, если только не оговорено противное, подтверждают ее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До сих пор мы изучали гены, расположенные в аутосомах. Они рекомбинируют таким образом, что при реципрокных скрещиваниях двух генетически чистых линий получается потомство F_1 , которое и генетически и фенотипически однородно. Это значит, что между признаком и полом особи, у которой проявляется этот признак, нет связи, поскольку аутосомные гены расщепляются независимо от генетического материала половых хромосом.

У дрозофилы пол не является единственным признаком, который определяется генетическим материалом, расположенным в половых хромосомах. Для ряда других признаков дрозофилы, кроме пола, реципрокные скрещивания двух разных чистых линий не дают одинаковых результатов. Разница проявляется в фенотипе одного пола. Гены, которые обнаруживают такое сцепление с полом, не располагаются в аутосомах. Y-хромосома не содержит аллелей этих генов, тогда как X-хромосома их содержит.

У человека
ку, тогда как
метны в отно
Иногда в
происходит р
не содержат
хромосомы.
гомозиготных
щивании их с
торое количе
одновременно
мосом. Необы
основании нео
Сцепление
дением гипоте
рассмотренных
дается столь
рассматривать
чащих.

ВОПРОСЫ ДЛЯ

7.1. При к
своего отца?

7.2. Какие
зофил ($X^{w+}Y$)
ходит нерасхо
в каждом случ

7.3. Можно
если он не сцеп

7.4. У муж
обоих страдаю

ребенок этой ч

а. нормальн

б. нормальн

в. сыном, с

г. дочерью,

7.5. Один и

ского пола) зд

а. Каков ве

б. Являются

г. Каковы г

7.6. Сын и

генотипы родит

7.7. Самец д

том тела и бел

типа (нормальн

отбираются сам

цами, как и их

Каковы ожиг

щивании?

7.8. Можно л

хромосомы? Поя

7.9. Какие со

лы в Y-хромосо

X-хромосоме отс

7.10. Перечис

которой хромосо

У человека и у дрозофилы XY представляет собой самца, а XX — самку, тогда как птицы и бабочки гетероморфны и, следовательно, гетерогаметны в отношении половых хромосом самки.

Иногда в результате нерасхождения половых хромосом в мейозе не происходит расщепления хромосом и образуются гаметы, которые либо не содержат половых хромосом, либо, наоборот, содержат две половые хромосомы. Если такое нерасхождение происходит у самок дрозофилы, гомозиготных по сцепленному с полом рецессивному гену, то при скрещивании их с самцом, содержащим доминантный аллель, появляется некоторое количество потомков, которые представляют собой исключение одновременно в отношении как сцепления с полом, так и содержания хромосом. Необычные свойства в одном отношении можно предсказать на основании необычных свойств в другом, и наоборот.

Сцепление с полом и нерасхождение служат дополнительным подтверждением гипотезы, согласно которой материальной основой всех до сих пор рассмотренных нами генов являются хромосомы. Эта гипотеза подтверждается столь многими и столь разнообразными данными, что ее можно рассматривать как теорию, тем более что нет данных, ей противоречащих.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

7.1. При каких условиях сын может не получить Y-хромосому от своего отца?

7.2. Какие генотипы зигот могут получиться при скрещивании дрозофил ($X^{w+}Y$) \times (X^wX^w), если во время мейоза и у самки, и у самца происходит нерасхождение половых хромосом? Какие фенотипы должны быть в каждом случае?

7.3. Можно ли утверждать, что ген сцеплен с половой хромосомой, если он не сцеплен ни с одной из аутосом? Поясните.

7.4. У мужа и жены нормальное зрение, несмотря на то, что отцы обоих страдают цветовой слепотой. Какова вероятность того, что первый ребенок этой четы будет:

- а. нормальным сыном?
- б. нормальной дочерью?
- в. сыном, страдающим цветовой слепотой?
- г. дочерью, страдающей цветовой слепотой?

7.5. Один из близнецов страдает гемофилией, тогда как второй (мужского пола) здоров.

- а. Каков вероятный пол близнеца, страдающего гемофилией?
- б. Являются ли близнецы монозиготными? Поясните.
- г. Каковы генотипы обоих близнецов и их матери?

7.6. Сын и отец страдают гемофилией. Каковы наиболее вероятные генотипы родителей и ребенка?

7.7. Самец дрозофилы с прерванной кубитальной жилкой, черным цветом тела и белыми глазами скрещивается с гомозиготной самкой дикого типа (нормальное жилкование, серый цвет тела и красные глаза). Затем отбираются самки первого поколения и скрещиваются с такими же самцами, как и их отец.

Каковы ожидаемые частоты генотипов и фенотипов в последнем скрещивании?

7.8. Можно ли утверждать, что материальной основой генов являются хромосомы? Поясните.

7.9. Какие соображения можно привести в пользу того, что у дрозофилы в Y-хромосоме отсутствуют гены, имеющиеся в X-хромосоме? что в X-хромосоме отсутствуют гены, имеющиеся в Y?

7.10. Перечислите данные, которые подтверждают теорию, согласно которой хромосомы являются материальными носителями генов.

7.11. Имеются ли данные, свидетельствующие о том, что в хромосоме содержится больше одного гена?

7.12. Какая часть всех генов гемофилии типа А имеется у мужчин? Обоснуйте свой ответ.

7.13. Если данный ген сцеплен с полом, то обязательно ли этот ген будет гемизиготен у особей одного пола? Поясните.

7.14. В пробирке было проведено скрещивание двух дрозофил фенотипически дикого типа. Случайно все потомство F_1 , за исключением одной мухи, погибло. Выжившая муха оказалась белоглазым самцом с черным цветом тела и с прерванной кубитальной жилкой. Каковы наиболее вероятные генотипы родителей?

7.15. При скрещивании чистых линий дрозофилы [самца с желтым цветом тела и самки с серым цветом тела (дикий тип)] в потомстве было получено 1241 самка серого цвета, 1150 самцов серого цвета и 2 самца желтого цвета. Реципрокное скрещивание дало 1315 самок серого цвета, 924 самцов желтого цвета и 1 желтую самку. Каков генный и хромосомный набор каждого из упомянутых выше типов потомков? Какова относительная жизнеспособность и плодовитость разных хромосомных типов?

7.16. Самки дрозофилы с зазубренными краями крыльев (фенотип Notch) скрещиваются с самцами дикого типа. В F_1 получаются следующие результаты: 550 ♀ дикого типа, 472 ♀ с зазубренными крыльями, 515 ♂ дикого типа. Дайте генетическое объяснение этому результату.

7.17. В лаборатории в течение многих генераций поддерживалась чистая по сцепленному с полом гену кораллового цвета глаз (*scarlet- w^{co}*) линия дрозофилы. Для того чтобы продемонстрировать студентам сцепление с полом, самца с коралловыми глазами скрестили с самкой дикого типа. Все потомки F_1 были такими, как и следовало ожидать. В реципрокном скрещивании самки с коралловыми глазами и самца дикого типа получилось следующее потомство: 62 самки с коралловыми глазами и 59 самцов дикого типа. Как можно объяснить такой необычный результат? Как можно проверить это объяснение?

7.18. У дрозофилы дикого типа глаза имеют яйцевидную форму. Определенная мутация X сужает глаза. При использовании чистых линий скрещивание (мутант ♀) × (дикий тип ♂), за редкими исключениями, дает в F_1 мутантных сыновей и дочерей, а скрещивание (дикий тип ♀) × (мутант ♂) дает в F_1 сыновей дикого типа и мутантных дочерей.

Сужение глаз происходит также в результате другой мутации Y. При использовании чистых линий дикого типа и мутанта Y скрещивание (мутант ♂ или ♀) × (дикий тип ♀ или ♂) дает соотношение 2 (мутанты ♂ ♂): 1 (дикий тип ♂ ♂ и ♀ ♀). Что можно сказать о мутациях X и Y?

7.19. Реципрокные скрещивания чистых линий дрозофилы с зачаточными крыльями (*vestigial*) и мух дикого типа дает F_1 только дикого типа. Какие генотипы и фенотипы должны возникнуть в потомстве при скрещивании F_1 ♂ и ♀ с белыми глазами и зачаточными крыльями, если учесть, что *w* сцеплен с полом?

7.20. Какое практическое применение может иметь знание генов, сцепленных с полом?

7.21. Нормальный мужчина с группой крови АВ женится на нормальной женщине с группой крови О, отец которой страдал гемофилией. Какие фенотипы можно ожидать в потомстве этих супругов и с какой относительной частотой?

7.22. На схеме (рис. 7—8) изображена часть родословной потомков королевы Виктории Английской (II), в которой отмечены случаи гемофилии (закрашено) только в поколении IV. Раскрасьте остальную часть родословной (гетерозиготы по гену гемофилии закрасьте наполовину).

II 1
II 2

III 1
III 2
III 3
III 5

ЛИТЕРА

C. B. Bridges.
1916. 1, 1
T. H. Morgan.
чатано в
lice-Hall.
дрозофил.

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| II 1 — Принцесса Алиса | IV 1 — Принц Вольдемар Прусский |
| II 2 — Леопольд, герцог Албанский | IV 3 — Принц Генри Прусский |
| III 1 — Ирен | IV 8 — Русский царевич Алексей |
| III 2 — Александра | IV 10 — Виконт Трематон |
| III 3 — Алиса | IV 12 — Альфонсо |
| III 5 — Виктория-Евгения | IV 17 — Гонзало |

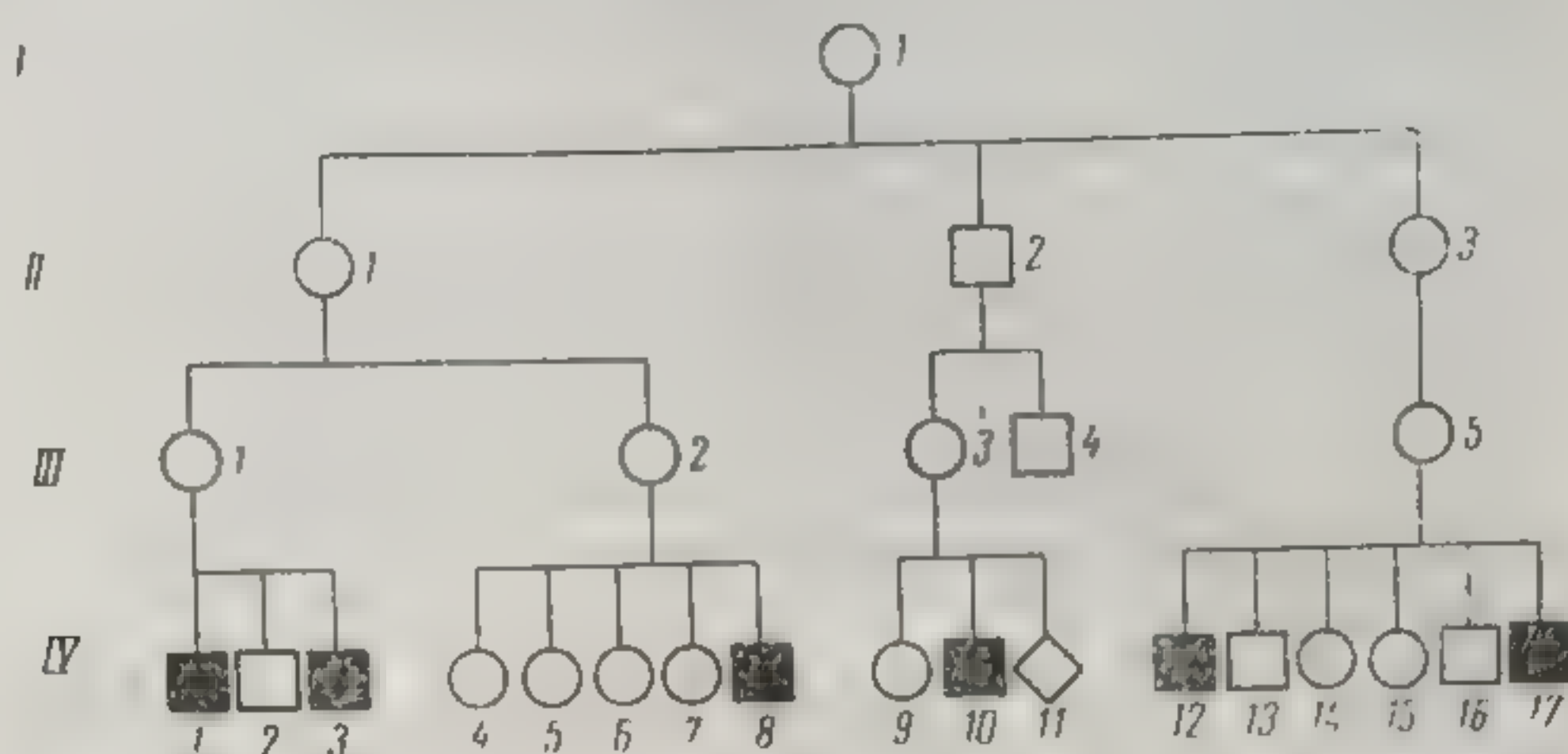


РИС. 7-8.

Часть родословной потомков королевы Виктории Английской (II) (по Дж. Холдейну)

ЛИТЕРАТУРА

- C. B. Bridges. Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. — *Genetics*, 1916, 1, 1, 107.
- T. H. Morgan. Sex limited inheritance in *Drosophila*. — *Science*, 1910, 32, 120. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics», Peters J. A. (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 63. (Т. Морган. Ограниченная полем наследственность у дрозофилы. Избранные труды по генетике. Сельхозгиз. 1937).

Глава 8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА

ДРОЗОФИЛА

В седьмой главе уже говорилось, что обычная самка *Drosophila melanogaster* представляет собой $3AA + XX$, а самец — $3AA + XY$. На основании одного только этого факта нельзя, однако, вскрыть хромосомную природу определения пола, поскольку мы имеем дело с двумя переменными — X и Y . Действительно, неясно, является ли самец самцом потому, что у него имеется Y -хромосома, или потому, что у него имеется только одна X -хромосома, или, наконец, потому, что у него имеется одна X - и одна Y -хромосома.

Зная пол мух, имеющих, кроме двух наборов аутосом, следующие наборы половых хромосом: XXY (самки), $XXYY$ (самки), XO (самцы), можно сделать заключение, что у данного организма Y -хромосома не определяет пола. (Как уже отмечалось в главе 7, Y -хромосома необходима для плодовитости: у самцов XO спермии неспособны к активным движениям.)

Итак, мы знаем, что у дрозофилы пол определяется альтернативными хромосомными наборами XX и X . Возникает вопрос: в чем заключается детальная генетическая основа пола, другими словами — какие гены, расположенные в X -хромосоме, определяют пол? Рассмотренные до сих пор данные можно интерпретировать так, что пол определяется только одной парой генов (в случае XX) или одним геном (в случае X). Такая интерпретация подразумевает следующее. Для сцепленного с X -хромосомой гена, определяющего пол, нет необходимости иметь альтернативный аллель, поскольку наличие одного такого гена приводит к образованию особей одного пола, а наличие двух — к образованию особей противоположного пола. Доминирования при этом нет. Можно также утверждать, что в Y -хромосоме нет аллеля этого гена. Однако для того чтобы связать данные генетики с данными цитологии в отношении дрозофилы и других организмов с гетероморфными половыми хромосомами, необходимо сделать еще два предположения:

1. ген, определяющий пол, должен быть расположен в той области X -хромосомы, по которой ее можно цитологически отличить от Y -хромосомы;

2. в пределах этого цитологически отличающегося сегмента между X - и Y -хромосомами не должно образовываться хиазм.

Эти постулаты необходимы для того, чтобы сохранить точное соответствие между морфологией X -хромосомы и содержанием в ней генного материала, определяющего пол. Следовательно, несмотря на то, что в участке, где X - и Y -хромосомы гомологичны (например, обе содержат аллели гена «подстриженный», *bobbed*), между ними могут возникать хиазмы, образующаяся при этом новая нить будет содержать ген, определяющий пол, если цитологически она выглядит как X -хромосома, и не будет содержать этого гена, если она цитологически выглядит как Y -хромосома. Эти требования кажутся весьма разумными, так как между цитологически отличающимися областями хромосом не образуется синапсиса, а при его отсутствии не могут происходить и обмены, приводящие к хиазмам.

Для того, чтобы лучше понять цитогенетическую основу пола, рассмотрим описанные в работе Стертеванта результаты скрещиваний некоторых лабораторных линий *D. melanogaster*. В одной линии вместо обычных

50% самок и 50% самцов получается необычное соотношение полов: примерно 75% самцов и 25% самок (табл. 8—1, А). Поскольку в этой необычной линии до стадии взрослых мух развивается тот же процент яиц, что и в обычной, этот ненормальный результат нельзя объяснить наличием гена, понижающего жизнеспособность самок.

Можно предположить, что в этом необычном случае на определение пола оказывает влияние аутосомный ген. Этот ген был назван *трансформатором*; было предположено, что он имеет два аллеля: *tra⁺* и *tra*. Предполагается, что гомозиготы по *tra* всегда являются самцами независимо от наличия генов X-хромосомы (*tra tra* эпистатично, а гены X-хромосомы гипостатичны) (см. главу 4, стр. 57—59), тогда как у гетерозигот и гомозигот

Таблица 8—1

НЕНОРМАЛЬНОЕ СООТНОШЕНИЕ ПОЛОВ У ДРОЗОФИЛЫ

| А. Фенотипы | Б. Генотипы |
|-------------------------|--|
| Самка × самец | $P_1 XXtra^+ tra \times XY tra tra$ $q_1 \frac{1}{2} X tra^+, \frac{1}{2} X tra \frac{1}{2} X tra, \frac{1}{2} Y tra$ $F_1 25\% XY tra tra \sigma$ |
| 75% самцов | $\begin{cases} 25\% XY tra^+ tra \sigma \\ 25\% XX tra tra \sigma \end{cases}$ (трансформированные ♀) |
| 25% самок | 25% $XXtra^+ tra \text{ ♀}$ |

по *tra⁺* пол определяется генами X-хромосомы (в этом случае гены пола, расположенные в X-хромосоме, эпистатичны). Поэтому XX особи, которые одновременно являются *tra tra*, будут самцами (*трансформированные самки*), что и объясняет их преобладание в потомстве. Так, скрещивание XY *tra tra* (самец) с XX *tra⁺ tra* (самка) дает в потомстве $\frac{1}{4}$ XY *tra tra* (самцы), $\frac{1}{4}$ XY *tra⁺ tra* (самцы), $\frac{1}{4}$ XX *tra tra* (самцы, трансформированные самки) и $\frac{1}{4}$ XX *tra⁺ tra* (самки) (табл. 8—1, Б), что и соответствует полученным в опыте соотношениям. Все эти предположения были проверены также с помощью других скрещиваний и подтвердились. Это доказывает, что аутосомные гены также участвуют в определении пола. Отметим только, что аллель *tra* встречается очень редко: почти все встречающиеся в природе дрозофилы оказываются гомозиготами по *tra⁺*.

Пока мы описали только два пола у дрозофилы. Однако иногда встречаются особи промежуточного пола, которые в некоторых отношениях представляют собой одновременно и самок и самцов. Такие промежуточные типы, которые называются *интерсексами* (см. рис. 8—1, В), стерильны. Интерсексы относительно часто встречаются в потомстве *триплоидных* самок (3N). На рис. 8—2 схематически изображены хромосомы таких триплоидов на стадии митотической метафазы. X-хромосомы на этом рисунке, в отличие от аутосом, закрашены в черный цвет, а Y-хромосома обведена пунктиром.

Часть гамет триплоидных самок гаплоидна, часть диплоидна, и, наконец, в остальных гаметах могут быть любые комбинации, когда одни хромосомы представлены в единственном числе, а другие — в двойном. При оплодотворении гаплоидных яйцеклеток спермиями нормальных самцов образуются нормальные самцы и самки. При оплодотворении диплоидных яиц спермием, содержащим X-хромосому, получаются триплоидные самки. При оплодотворении диплоидной яйцеклетки спермием, содержащим Y-хромосому, получаются мухи с набором половых хромосом XXU и с тройным набором аутосом. Такие мухи являются интерсексами. Другие интерсексы содержат три набора аутосом и XX, одну X-хромосому они получили из яйцеклетки, в которой имелось два набора аутосом, а другую X-хромосому — из спермия.

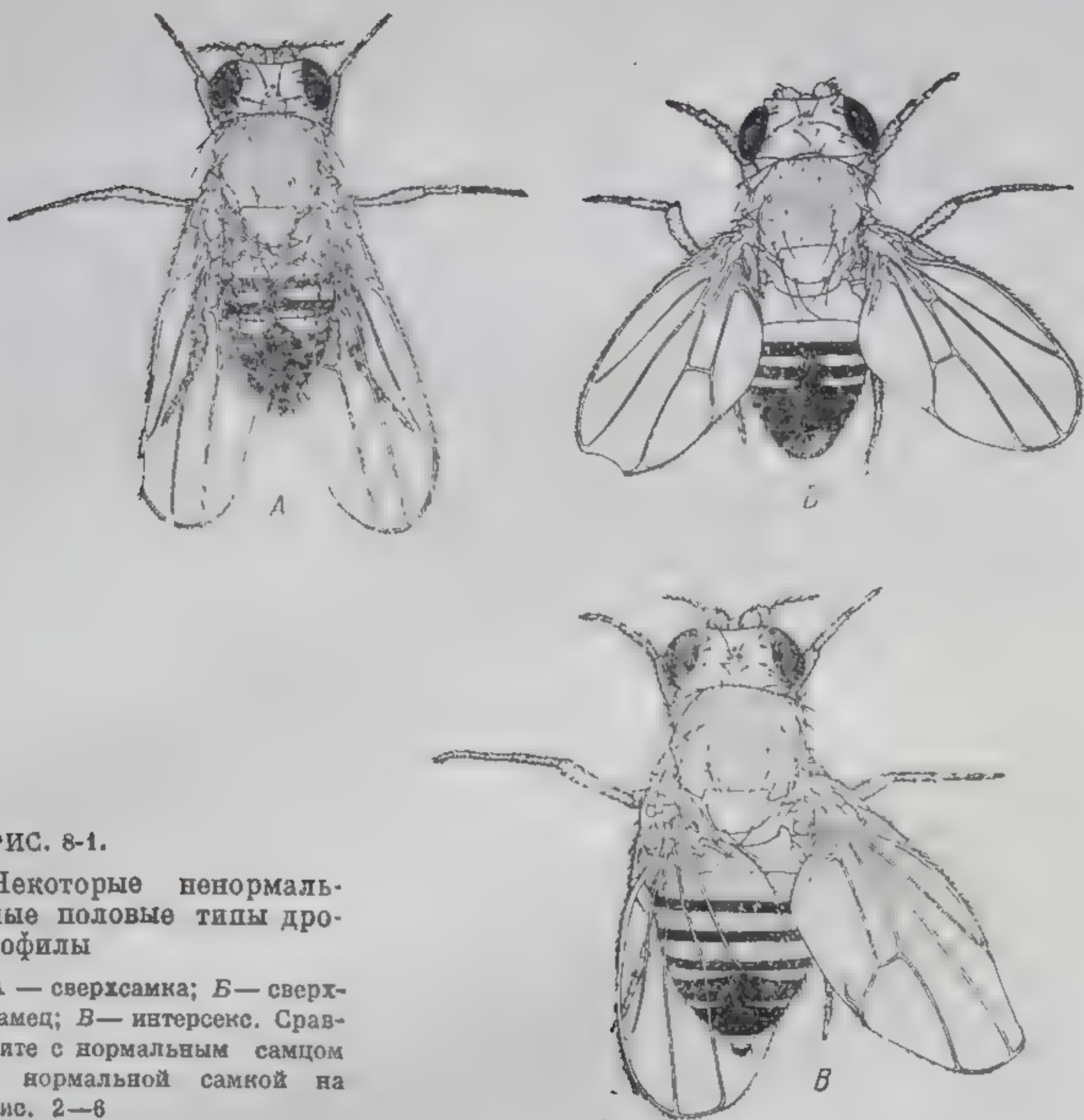


РИС. 8-1.

Некоторые ненормальные половые типы дрозофилы

А — сверхсамка; Б — сверхсамец; В — интерсекс. Сравните с нормальным самцом и нормальной самкой на рис. 2—8

При внимательном изучении оказалось, что среди потомства триплоидных дрозофил встречаются еще два половых типа (рис. 8—1, 8—2). Они выглядят не как интерсексы, а как стерильные «суперсексы» — у одних особей характерные признаки женского пола проявляются с большей силой, чем у нормальных самок (такие мухи называются *сверхсамками*), тогда как у других особей гипертрофированы признаки мужского пола (такие мухи называются *сверхсамцами*). Сверхсамки содержат двойной набор аутосом и три X-хромосомы и развиваются из яйцеклеток, содержащих один набор аутосом и две X-хромосомы после оплодотворения спермием с X-хромосомой. Они обычно гибнут, не достигнув зрелости (см. стр. 105) у сверхсамцов имеется три набора аутосом и XY. Развиваются они из яйцеклеток, содержащих двойной набор аутосом и одну X-хромосому и оплодотворенных спермием с Y-хромосомой.

Какие заключения о характере определения пола можно сделать на основании этих сведений о хромосомном наборе разных половых типов дрозофилы? ¹

Имея в виду, что пол определяется генами, расположенными как в X-хромосоме, так и в аутосомах, рассмотрим таблицу 8—2, в которой для каждого полового типа указано число X-хромосом и число аутосом, а также отношение числа X-хромосом к числу наборов аутосом (так называемый *числовой половой индекс*). Этот индекс изменяется от 0,33 для сверхсамок до 1,5 для сверхсамцов. Заметим, что при индексе 0,5 развивается усиление тенденции к образованию мужского пола, в результате чего полу-

¹ Дальнейшее изложение основано на данных К. Бриджеса.

чается сверхсамец. Когда половой индекс равен 1,0, развиваются нормальные самки. При этом тенденция к образованию женского пола, контролируемая одной X-хромосомой, пересиливает тенденцию к образованию мужского пола, контролируемую одним набором аутосом. Если же индекс лежит между 0,5 и 1,0,— получают интерсексы. По аналогичным соображениям это происходит вследствие того, что влияние двух X-хромосом частично пересиливается одним лишним набором аутосом. И, наконец, когда индекс равен 1,5, влияние X-хромосом в сторону образования женского пола становится столь велико, что развиваются сверхсамки.

Таблица 8—2

половой индекс и тип пола у *D. melanogaster*

| Фенотипы | Число X-хромосом | Число наборов аутосом (А-наборов) | Половой индекс | |
|------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------|
| | | | число X-хромосом | число А-наборов |
| Сверхсамка | 3 | 2 | 1,5 | |
| Нормальная самка | тетраплоид | 4 | 1,0 | |
| | триплоид | 3 | 1,0 | |
| | диплоид | 2 | 1,0 | |
| | гаплоид | 1 | 1,0 | |
| Интерсекс | 2 | 3 | 0,67 | |
| Нормальный самец | 1 | 2 | 0,50 | |
| Сверхсамец | 1 | 3 | 0,33 | |

Эти результаты свидетельствуют о том, что пол определяется соотношением генов, расположенных в X-хромосоме, и генов, расположенных в аутосомах. В соответствии с этой точкой зрения существенную роль играет только соотношение генов, так что при индексе 1,0 должны образовываться типичные самки независимо от того, является ли особь диплоидом ($2X + 2$ набора аутосом), триплоидом ($3X + 3$ набора аутосом) или тетраплоидом ($4X + 4$ набора аутосом), что и наблюдается в действительности.

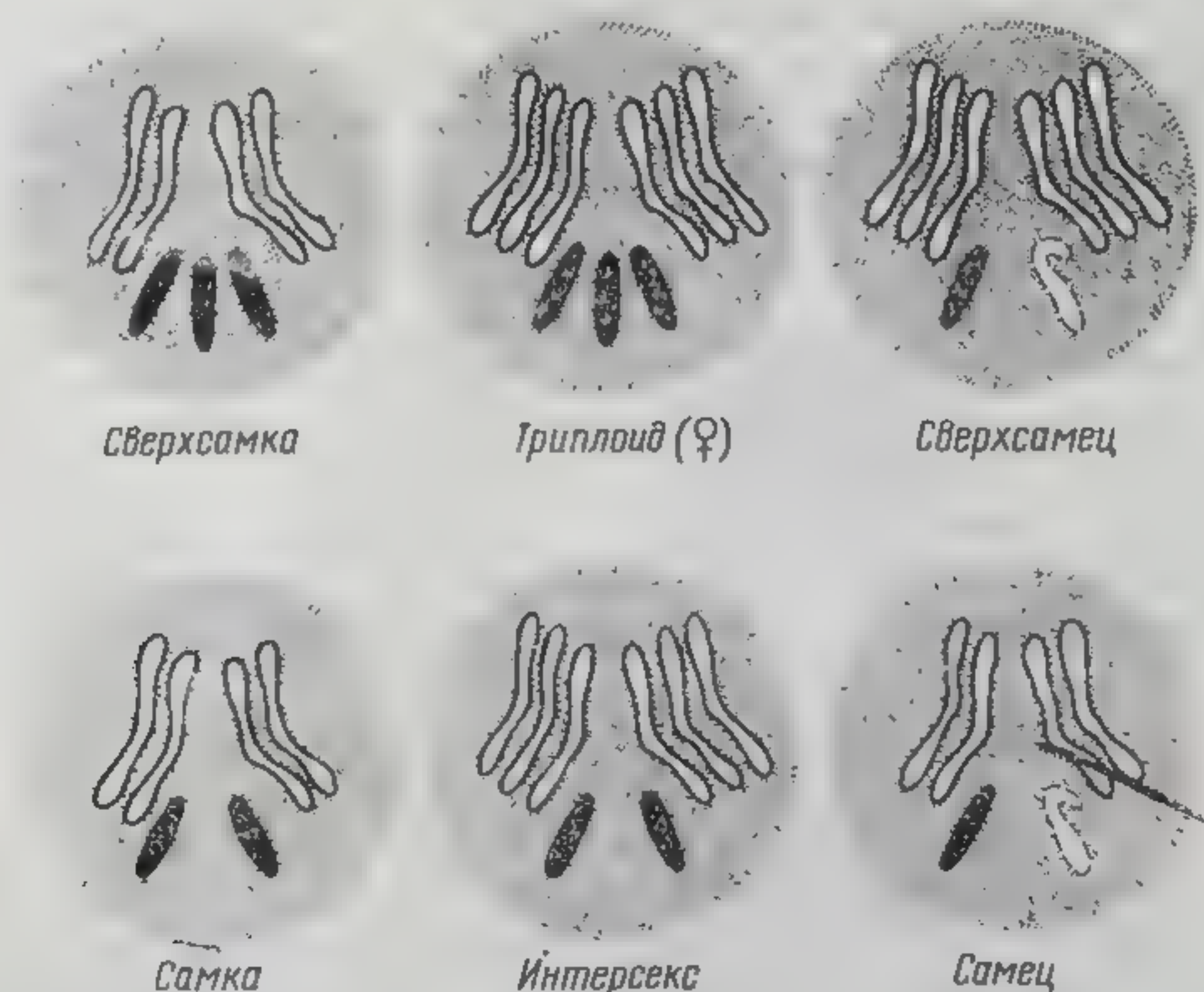


Рис. 8-2.

Хромосомный набор разных половых типов, встречающихся в потомстве триплоидных самок *D. melanogaster*

Были обнаружены особи, у которых некоторые части тела содержат гаплоидный набор ($1X + 1$ набор аутосом). Как и следовало ожидать, исходя из полового индекса, равного в этом случае 1,0, эти части тела обладают типичными признаками женского пола. Поскольку все известные факты подтверждают точное соответствие между половым типом и хромосомным составом, можно принять, что пол у дрозофилы обычно определяется соотношением или балансом хромосом.

Какова связь между соотношением аутосом и X-хромосом и геном *tra*, трансформирующим пол? Когда особи содержат *tra*⁺, пол определяется балансом аутосом и X-хромосом. Такой случай встречается чаще всего. Когда же особь гомозиготна по *tra*, балансовая теория определения пола уже неприменима и при наличии набора $2X + 3AA$ получается самец.

ГИНАНДРОМОРФЫ

В популяции дрозофилы изредка встречаются необычные мухи, у которых одни части тела обладают признаками мужского пола, а другие — женского. Такие мухи мозаичны по половым признакам и называются гинандроморфами (рис. 8—3). Мужские и женские участки тела у них четко разделены. В одних случаях признаками противоположного пола обладают передняя и задняя половины, в других — правая и левая стороны тела. Наличие резкой границы между участками тела мужского и женского типа и гинандроморфных насекомых объясняется тем, что в процессах дифференциации гормоны играют у них относительно малую роль и каждая часть тела формируется в соответствии со своим собственным генотипом. Исходя из ранее приведенных соображений, можно ожидать, что у гинандроморфов во всех диплоидных клетках женской части тела содержится по две X-хромосомы, в клетках мужской части — по одной X-хромосоме, а аутосомный хромосомный набор везде нормален. Если это так, то гинандроморфы, у которых примерно половина тела имеет признаки мужского пола, а половина — женского, могли возникнуть следующим образом. Муха начинает свое развитие из зиготы $3AA + XX$, т. е. как самка; однако первое митотическое деление ядра зиготы происходит ненормально. Одно дочернее ядро нормально и содержит $3AA + XX$, а другое дочернее ядро дефектно и содержит $3AA + X$, так как одна из X-хромосом, которая должна была войти в него, дегенерировала и была поэтому потеряна. Затем следуют нормальные деления ядер. Клетки, образовавшиеся в результате митоза ядра с двумя X-хромосомами, дают



РИС. 8-3.

Гинандроморф *D. melanogaster*. Левая часть — женского пола, правая — мужского

ткани женского пола, а клетки, происходящие от ядра с одной X-хромосомой, — ткани мужского пола. В этом случае у гинандроморфа одна половина имеет признаки мужского, а другая половина — признаки женского пола. Если же X-хромосома была потеряна во время какого-либо более позднего митоза, участок тела, имеющий признаки мужского пола, будет соответственно меньше. Таким образом, можно объяснить существование гинандроморфов, у которых одна четверть или еще меньшая часть тела принадлежит мужскому полу.

Для того, чтобы показать, что такое объяснение в ряде случаев бывает правильным, можно воспользоваться сцепленным с X-хромосомой геном, который фенотипически проявляется на большей части тела, а именно геном, влияющим на размер и форму щетинок. Этот ген называется *вилчатые щетинки* (forked), два его аллеля обозначаются f^{34a} и f . У мух, гомозиготных (самки) и гемизиготных (самцы) по f^{34a} , щетинки имеют нормальную длину и форму. Однако у мух, несущих f , имеются укороченные, согнутые и раздвоенные на конце щетинки. У гетерозигот f^{34a}/f щетинки ненормальны в меньшей степени и их фенотип называется «слабо выраженные вилчатые щетинки». В отношении потомства такого скрещивания, в котором потомки женского пола были бы гетерозиготами f^{34a}/f , о фенотипе изредка возникающих среди сибсов гинандроморфов можно сделать следующие предсказания: у всех гинандроморфов, образовавшихся указанным выше путем, части тела с признаками женского пола будут иметь фенотип *слабо выраженные вилчатые щетинки*, а на частях тела с признаками мужского пола будут либо нормальные щетинки, либо ярко выраженный фенотип *вилчатые щетинки*, в зависимости от того, какой ген содержался в утерянной X-хромосоме — f или, соответственно, f^{34a} . Результаты проведенных опытов полностью подтверждают эти предсказания.

Гинандроморфы встречаются и среди бабочек. У самцов бабочек обычно бывают большие красиво раскрашенные крылья, а у самок — маленькие и короткие. Были обнаружены гинандроморфы, у которых крылья на одной стороне такие же, как у самцов, а на другой — как у самок. Эти исключения можно объяснить примерно так же, как и в случае дрозофилы. Однако у бабочек гинандроморфы обычно начинают развиваться как мужская зигота XX.

Таким образом, можно объяснить возникновение большинства гинандроморфов дрозофилы и других насекомых, у которых самцы обладают гетероморфными половыми хромосомами; однако некоторые гинандроморфы возникают иначе. Крайне редко после мейоза возникает ненормальная яйцеклетка, в которой содержится не одно, а два гаплоидных ядра. Поскольку у насекомых иногда встречается полиспермия, т. е. проникновение в яйцеклетку нескольких спермиев (хотя в норме в оплодотворении ядра участвует только один), одно из двух гаплоидных ядер такой необычной яйцеклетки может оплодотвориться спермием, несущим X-хромосому, а другое — спермием, несущим Y-хромосому. Образовавшаяся при этом особь будет гинандроморфом (наполовину самцом, наполовину самкой). Такой тип гинандроморфа можно идентифицировать, если два отцовских или два материнских гаплоидных ядра гамет по-разному маркированы по паре аутосомных генов.

ЧЕЛОВЕК И МЫШЬ

У людей пол определяется при оплодотворении. Зиготы, содержащие XY, развиваются в индивидуумов мужского пола, а XX зиготы — в индивидуумов женского пола. В начале эмбрионального развития половые железы, или *гонады*, нейтральны, т. е. они не обнаруживают макроскопических признаков, на основании которых можно было бы решить, во что разовьется данная гонада: в семенник или в яичник. Ранняя гонада состоит из двух

слоев: внешнего *кортикального* и внутреннего, *медуллярного*. В процессе развития у эмбрионов с Y-хромосомой (мужской пол) кортикальный слой дегенерирует, а из медуллярного развиваются семенники; у особей с генотипом женского пола дегенерирует медуллярный слой, а из кортикального формируется яичник.

Как только образуются семенники или яичники, они начинают контролировать дальнейшую половую дифференциацию с помощью продуцируемых ими гормонов. Эти гормоны направляют развитие или дегенерацию различных половых протоков, образование половых органов и других вторичных половых признаков. Поскольку половая дифференциация находится в значительной мере под контролем половых гормонов, то не удивительно, что среди генетически нормальных индивидуумов наблюдаются вариации в отношении морфологических половых признаков. Действительно, любое изменение внешних условий, влияющее на образование половых гормонов или на реакцию тканей на эти гормоны, может вызвать изменение фенотипического проявления пола. Таким образом, фенотипы, которые обычно рассматриваются как мужской и женский пол, проявляют определенную вариабельность. Поэтому у генетически нормальных людей при воздействии ненормальных внешних условий могут развиваться фенотипы, лежащие между двумя нормальными половыми типами. Такие индивидуумы выглядят как интерсексы. Иногда бывает легко установить, что данный индивидуум является интерсексом, если он явно обладает промежуточным фенотипом. Относительно других лиц, фенотип которых находится на грани нормы, часто бывает трудно решить, интерсексуальны ли они, суперсексуальны или нормальны. Интерсексуальные фенотипы, обусловленные воздействием внешних условий, могут возникать как в результате частичного развития в направлении к женскому полу индивидуумов с мужским генотипом, так и в результате частичного развития в направлении к мужскому полу индивидуумов с женским генотипом.

Встречаются люди, диплоидные по аутосомам, но с разным количеством половых хромосом. Диплоиды по аутосомам с одной половой хромосомой бывают только одного типа: это XO-особи женского пола. Типичное фенотипическое проявление такого хромосомного набора носит название *синдрома Тернера* (по имени ученого, впервые описавшего этот синдром) и выражается в том, что женщины не достигают половой зрелости. У женщин с синдромом Тернера сильно недоразвиты молочные железы, не происходит овуляции и менструации. Из-за вариаций в генетической конституции и внешних условиях (включая лечение) фенотипическое проявление хромосомного набора XO подвержено значительной изменчивости. Известна, например, одна женщина с таким хромосомным набором, у которой родился нормальный (XY) сын. У мышей XO фенотипические вариации проявляются в гораздо меньшей степени: они, по-видимому, всегда бывают плодовитыми самками. Другой хромосомный набор с одной половой хромосомой (YO) у человека, очевидно, летален. Для мышей это доказано строго.

Диплоиды по аутосомам с тремя половыми хромосомами бывают трех типов: XXX являются женщинами (иногда умственно недоразвитыми), XYY и XXY — мужчинами. Мужчины XXY обычно стерильны, половые органы у них недоразвиты. Кроме того, у них может развиваться ряд вторичных половых признаков женщины. Это *синдром Клайнфельтера*, названный по имени ученого, описавшего его. Как и в случае женщин XO, в фенотипическом проявлении синдрома Клайнфельтера наблюдаются значительные вариации. Например, некоторые мужчины с этим синдромом отличаются умственной отсталостью, в то время как другие — нет. Кроме того, хотя во всех известных до сих пор случаях такие мужчины были стерильны, у некоторых из них наблюдалось нормальное половое влечение. У мышей XXY особи являются стерильными самцами.

Известны еще диплоиды по аутосомам со следующими наборами половых хромосом: XXXX (♀); XXXY (♂); XXY (♂); XXXX (♀); XXXY (♂); XXY (♂). Отсюда видно, что в противоположность дрозофиле, и у человека и у мыши Y-хромосома оказывает решающее воздействие на определение пола. Для развития особи мужского пола достаточно наличия одной Y-хромосомы; отсутствие Y-хромосомы приводит к образованию особи женского пола. Для того, чтобы особь была жизнеспособна, обязательно наличие X-хромосомы.

Поскольку у человека и у мыши пол определяется наличием или отсутствием Y-хромосомы, по-видимому, в той характерной области этой хромосомы, по которой она идентифицируется цитологически, должен находиться один или несколько генов, определяющих мужской пол, тогда как в X-хромосоме не должно быть соответствующего аллеля или аллелей. Приняв, что наличие в Y-хромосоме генов, определяющих мужской пол, приводит к образованию мужского организма, можно задать вопрос: что же обуславливает развитие женского организма в отсутствие Y-хромосомы? Очевидно, имеются еще и другие гены, влияющие на пол и расположенные не в Y-хромосоме. Эти гены направляют развитие в сторону женского пола. Наличие женских признаков у людей с хромосомным набором XXY говорит о том, что X-хромосома содержит гены, которые влияют на нормальную половую дифференциацию и, если они имеются в избытке, вызывают сдвиг в сторону женского пола. По-видимому, X-хромосома сохраняет эту способность и в отсутствие Y-хромосомы.

Все случаи, когда во всех клетках тела содержится одинаковый ненормальный набор половых хромосом, можно объяснить нерасхождением хромосом, в результате чего происходит либо потеря, либо приобретение лишних хромосом. Нерасхождение имеет место либо во время мейоза, либо в начале дробления оплодотворенной яйцеклетки (вероятно, во время первого деления). Частота таких нерасхождений у женщин увеличивается с возрастом.

Кроме того, на основании изучения распределения мутаций, сцепленных с X-хромосомой, было показано, что нерасхождение, приводящее к ненормальному числу половых хромосом, иногда происходит среди хромосом, полученных от отца. Такой источник аномалий иллюстрируется случаем, когда мужчина, страдавший цветовой слепотой, имел дочь XO с нормальным зрением. Поскольку в яйцеклетках некоторых старых дрозофил происходит потеря отцовских хромосом после оплодотворения, необходимо учитывать возможность того, что потеря отцовской хромосомы у человека может происходить как до, так и после мейоза. Благодаря премеиотическому нерасхождению отцовских хромосом у женщины с цветовой слепотой может родиться сын с синдромом Клайнфельтера и нормальным зрением.

Довольно большое количество людей, у которых разные части тела отличаются по хромосомному набору, представляют собой организмы, мозаичные по половым хромосомам. Известны мозаики следующих типов: XXX/XO; XX/XO; XY/XO; XXY/XX; XXXY/XY. Эти аномалии обычно бывают обусловлены происходящими после оплодотворения нарушениями в распределении хромосом между дочерними ядрами. Хотя такие организмы и мозаичны, а некоторые из них даже имеют одну гонаду типа яичника, а другую — типа семенников, по своим внешним признакам они не являются гинандроморфами, так как половые гормоны распространяются по всему телу. Хотя XXY мужчины часто представляют собой типичных интерсексов, аналогичных им женщин, XO, XXX, отличающихся неполным половым созреванием, лучше рассматривать как «инфрасамок» из-за их половой недоразвитости. На основании всего выше сказанного должно стать очевидным, что первопричина некоторых специфических половых аномалий может заключаться либо в аномальных внешних условиях, либо

в аномальном хромосомном наборе (следует еще иметь в виду возможность существования и других мутаций, кроме изменения числа половых хромосом, влияющих на пол). Учитывая все это, ясно, что для постановки диагноза, а, следовательно, и выбора метода лечения половых аномалий желательно проводить подсчет числа хромосом.

СООТНОШЕНИЕ ПОЛОВ У ЧЕЛОВЕКА

Рассмотрим, как генотип связан с соотношением полов, т. е. относительным числом рождающихся мальчиков и девочек. В среднем на каждые 100 девочек рождается 106 мальчиков. Такое соотношение на первый взгляд может показаться удивительным, поскольку следует ожидать, что половина спермиев содержит X-, а половина Y-хромосому и все яйцеклетки содержат X-хромосому, так что соотношение мальчиков и девочек должно было бы быть равно 1 : 1. Однако даже в том случае, когда все четыре продукта мейоза данной клетки, возникшие в процессе сперматогенеза, представляют собой X, X, Y, Y, существует возможность, что во время или после спермиогенеза (превращения телофазных клеток II в спермии) часть спермиев с X-хромосомой утрачивается. Такое предположение подтверждается тем, что в эякуляте человека обнаружены спермии двух типов, отличающихся по форме и размеру головки (L. Shettles, 1960) (рис. 8—4). Если предположить, что спермии меньших размеров содержат Y-хромосому, а спермии большего размера содержат более крупную X-хромосому, то превышение числа мальчиков при оплодотворении хорошо объясняется наблюдаемым превышением числа спермиев меньшего размера. Имеются и другие данные, подтверждающие, что при оплодотворении получается гораздо больше мальчиков, чем девочек. Однако в норме происходит больше спонтанных аборт эмбрионов мужского пола, чем женского, и по этому отношению числа мальчиков и девочек при рождении ближе к единице, чем при зачатии.

При изучении соотношения полов у новорожденных оказалось, что отношение 1,067 : 1 наблюдается только у молодых родителей и постепенно уменьшается с возрастом, достигая 1,036 : 1 среди детей пожилых родителей. Как можно объяснить это существенное уменьшение? Возможно, с возрастом матери увеличивается либо вероятность аборта эмбриона мужского пола с нормальным хромосомным набором, либо вероятность потери хромосом во время первых митотических делений оплодотворенной яйцеклетки. Потеря X-хромосомы в зиготе XY окажется летальной, так что при этом произойдет аборт эмбриона, который стал бы мальчиком. Если же X-хромосому потеряет зигота XX, все равно может родиться девочка. Более того, если в зиготе XY будет потеряна Y-хромосома, вместо мальчика может родиться девочка. Может играть роль и повышение частоты нерасхождения хромосом с увеличением возраста матери (зиготы XXX дают жизнеспособных детей женского пола, а YO, по-видимому, гибнут до рождения).

Следует учитывать и возможность того, что отцы тоже в какой-то мере ответственны за это изменение соотношения полов. С возрастом отца может увеличиваться постмейотическая селекция, направленная против спермиев с Y-хромосомой. Возможно, по мере старения отцов увеличивается вероятность того, что в XY-тетраде произойдет нерасхождение и в результате этого образуются спермии, содержащие соответственно XX, YY, O. Первые два спермия могут дать нормальных дочерей, последний — недоразвитую дочь XO и только YY может в принципе дать начало организму мужского пола. Особь XYU должна быть мужского пола; однако такие эмбрионы часто погибают. Возможны также и другие как генетические, так и негенетические объяснения изменения соотношения полов с возрастом. Все приведенные выше соображения всего лишь демонстрируют, как мож-

но, используя основные положения о природе определения пола, о потере и нерасхождении хромосом, строить различные гипотезы, с тем, чтобы затем подвергнуть их экспериментальной проверке.

При изучении родословных под углом зрения соотношения полов иногда обнаруживаются случаи, когда подряд рождается несколько детей одного пола. Это, естественно, может быть результатом простого совпадения, если изучено большое количество родословных. Однако описана семья, в которой подряд родилось 47 мальчиков. Известен и другой достоверный случай, когда в одной семье подряд родилось 72 девочки. Практически невероятно, чтобы эти два примера были результатом простой случайности.

Пока неизвестно, чем объясняются такие случаи у человека, однако сходные ситуации появления у дрозофилы потомства почти исключительно женского пола могут помочь понять причину существования у человека таких родословных, в которых рождаются дети только одного пола. В первом из случаев, о которых пойдет речь, было обнаружено, что за появление в потомстве почти исключительно одних самок были ответственны их ХУ отцы, которые несут ген *соотношение полов*. Под влиянием этого гена Х- и Y-хромосомы не образуют синапсиса, а Х-хромосома реплицируется лишний раз, образуя тетраду. Поскольку почти все Y-хромосомы во время мейоза дегенерируют, почти все спермии содержат Х-хромосому. Во втором случае причина коренится в самках, которые передают через яйцеклетку своим потомкам определенный микроорганизм — спирохету. При скрещивании таких самок с нормальными самцами образуются, как обычно, зиготы, которые начинают развиваться. Однако в самом начале развития спирохеты убивают эмбрионы ХУ, так что почти все выжившие особи представляют собой самок.

Соотношение полов можно было бы изменять по желанию, если бы имелась возможность контролировать генотипы зигот. Поскольку у человека спермии, содержащие Х- и Y-хромосомы, очевидно отличаются цитологически (рис. 8—4), теоретически возможно отделить их друг от друга и таким образом контролировать пол потомства. Исследователи, работающие в России, Соединенных Штатах и Швеции, провели на различных животных ряд безуспешных опытов в этом направлении с использованием электрофореза и центрифугирования. Хотя эти эксперименты и дали обнадеживающие результаты, они тем не менее не всегда однозначны, а созданные методики пока еще не пригодны для практического использования.



РИС. 8-4.

Форма головки спермиев человека

Спермии с круглой головкой меньше по размерам и встречаются в большем числе, чем спермии с овальной головкой. Вероятно, в первых содержится Y-, а во вторых — X-хромосома

ПЕРЕПОНЧАТОКРЫЛЫЕ

У перепончатокрылых, например пчел, муравьев, ос и пильщиков, из неоплодотворенных яйцеклеток развиваются гаплоидные самцы, а из оплодотворенных обычно развиваются диплоидные самки. Гаплоидные самцы, в результате соответствующим образом модифицированного мейотического процесса, образуют гаплоидную сперму. Все гаметы как самок, так и самцов обладают морфологически идентичным хромосомным набором.

У осы-паразита *Habrobracon juglandis*, в случае близкого родства между родителями, часть потомства мужского пола оказывается гаплоидной, но у другой части, подобно потомству женского пола, имеется десять пар хромосом. Генетическое изучение таких диплоидных самцов показывает, что они происходят от двух отцов. Диплоидные самцы отличаются пониженной жизнеспособностью. Изучение скрещиваний внутри линий и между ними подтверждает представление о том, что у этого организма пол определяется серией множественных аллелей (P. W. Whiting, 1943). Особи, гаплоидные по этому генному локусу или области хромосомы, являются самцами, диплоидные гетерозиготы — самками, а диплоидные гомозиготы — полустерильными самцами.

РОЛЬ ГЕНОТИПА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОЛА

У некоторых организмов и мужские и женские гаметы образуются одной и той же особью. Такие животные называются *гермафродитами* (от имен Гермеса и Афродиты), а растения — *однодомными*. В гонадах гермафродитов-улиток *Helix* образуются и спермии и яйцеклетки, причем из клеток, которые могут располагаться очень близко друг от друга. У земляного червя яйцеклетки и спермии образуются в разных гонадах, расположенных в разных сегментах тела. Аналогично этому, у некоторых мхов яйцеклетки и спермиоподобные гаметы образуются в разных половых органах (расположенных на одном и том же гаплоидном гаметофите).

Во всех этих случаях организм, образующий два типа гамет, обладает единым генотипом, т. е. генетически не мозаичен. Тем не менее можно было бы предположить, что яйцеклетка и спермий различаются по своему гаплоидному генотипу, и поэтому отличается и их фенотип, и их поведение. Однако в случае гаметофитов мхов особь, образующая гаметы, гаплоидна, так же как и образуемые ею гаметы. Поэтому нельзя ожидать, что причиной образования гамет, а также разницы между ними у таких организмов может служить различие в содержании генов.

Образование гамет у гермафродитов и однодомных растений должно зависеть, таким образом, в основном, от различий во внешних условиях. Эти различия должны существовать даже для близлежащих клеток, как в случае улиток. Разумно предположить, что те же факторы, которые могут заставить одну группу клеток образовать мышцу, а соседнюю группу — превратиться в клетки костной ткани, способны вызвать дифференциацию третьей группы клеток в ткань гонады, в которой в свою очередь соседние клетки могут далее дифференцироваться в яйцеклетки и спермии.

Отметим, однако, что имеется и другой тип половой дифференциации, который, по крайней мере у некоторых организмов типа мхов, не связан с образованием гамет. Эта проблема, которую мы здесь не будем подробно обсуждать, связана с генетическими и внешними условиями, ответственными за начало мейоза, несомненно являющегося основным фактором, определяющим успех полового процесса у многих видов.

В приведенных примерах тип образовавшихся гамет зависел от разного местоположения клеток в одном организме, в результате чего они подвергались различным внутренним и внешним воздействиям. У морского кольчатого червя *Ophryotrocha* пол определяется размером организма. Когда животное мало по размерам либо потому, что еще не выросло, либо

потому, что представляет собой отделившуюся часть большего организма, оно образует спермию. Когда червь вырастает, та же самая особь начинает образовывать яйцеклетки. В этом случае внешние по отношению к гонадам условия изменяются с ростом организма.

Рассмотрим, наконец, определение пола у морского червя *Bonellia*, у которого особи противоположного пола резко отличаются как по внешнему виду, так и по своему поведению. Самки размером с грецкий орех обладают длинным хоботком, а самцы представляют собой микроскопические организмы с ресничками, ведущие паразитический образ жизни в теле самок. Оплодотворенная яйцеклетка развивается в самку в отсутствие взрослых самок, а в присутствии взрослых самок или даже экстракта из их хоботка оплодотворенная яйцеклетка развивается в самца. Таким образом, в этом случае вообще вся дифференциация, включая половую, регулируется присутствием или отсутствием в окружающей среде химических веществ, продуцируемых самкой.

Пока ничего не было сказано о специфической генетической основе определения и дифференцировки полов в описанных случаях, поскольку разные половые типы и разные типы гамет определялись не генетическими различиями между клетками, органами или организмами, а различиями в условиях среды, действующей на одинаковые генотипы. Тем не менее и в этих случаях гены должны играть важную роль, позволяя клеткам по-разному реагировать на разные внешние условия.

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛОВОГО ПРОЦЕССА

Если бы размножение всегда проходило бесполом путем, то и тогда Земля была бы заселена генетически различающимися организмами. Каждый вариант возникал бы в результате мутации в предыдущей особи, которая в свою очередь произошла из непрерывной линии поколений. Однако такое прямое наследование мало эффективно, поскольку биологически приспособленные особи, для того чтобы стать более приспособленными, должны ждать возникновения редко происходящих мутаций.

Появление полового процесса дает колоссальные генетические преимущества по сравнению с бесполом размножением. При половом процессе возможны генетические рекомбинации, которые ускоряют процесс эволюции, т. е. процесс создания более приспособленных организмов. Более приспособленный генотип может возникнуть в результате объединения в одном организме аллельных и не аллельных генов, принадлежавших до этого обоим родителям, причем родители могли быть хуже или даже плохо приспособлены к окружающим условиям. Поскольку в норме рекомбинация каждой пары генов происходит в каждом поколении, то адаптивные комбинации генов возникают гораздо чаще за счет рекомбинации, чем за счет относительно редких мутаций. Отсюда должно быть очевидно, что громадное разнообразие приспособленных особей, существующих сейчас на Земле, обеспечено в первую очередь половым процессом, который за тот же период времени образует большее разнообразие приспособленных генотипов, чем бесполое размножение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для того чтобы понять природу пола, необходимо ответить на два вопроса: какие факторы ответственны за начало мейоза? какова природа образования гамет разного типа? В этой главе относительно подробно обсуждался только второй вопрос. Было показано, что в ряде случаев пол в первую очередь определяется внешними условиями, а в ряде случаев — генотипом. Когда пол определяется генотипом, часто удается связать различия между полами с различиями в хромосомном наборе.

Гены, ответственные за определение пола, располагаются не только в половых хромосомах, но и в аутосомах. Хотя пол может быть изменен под действием всего лишь одной пары генов, каждый пол обычно является результатом взаимодействия нескольких, возможно, многих пар генов. Пол, таким образом, является полигенным признаком (глава 5).

Различие в хромосомном наборе зигот является видимым проявлением разницы в балансе генов, участвующих в определении пола. Если, как в случае самок дрозофилы, при добавлении или потере полного набора хромосом баланс генов не изменяется, то не изменяется и пол. Те же изменения числа хромосом, которые приводят к промежуточным значениям баланса генов, приводят к образованию и промежуточных типов пола — интерсексов. Изменения, приводящие к балансу, выходящему за границы нормы, вызывают появление суперсексов.

Эти принципы применимы и к человеку. У людей и у многих других организмов значительная часть половой дифференциации находится под контролем гормонов, образуемых гонадами. Подобный механизм контроля делает невозможным или маловероятным возникновение таких особей, у которых одни части тела обладают признаками мужского пола, а другие — женского. Этот механизм может также быть причиной возникновения ненормальных половых типов, не обусловленных генетически.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

8.1. Если половое размножение обладает такими преимуществами, то почему так много организмов до сих пор размножается бесполом путем?

8.2. Может ли изучение определения пола служить проверкой теории, согласно которой хромосомы служат материальной основой генов? Поясните.

8.3. Можно ли по отдельности рассматривать факторы, ответственные за процесс мейоза и за образование гамет? Поясните.

8.4. Почему преимущества полового процесса определяются в первую очередь именно наличием мейоза?

8.5. Каковы генотипы и фенотипы нормальных потомков скрещивания $f^{34e}/f \times f$ дрозофилы, а также потомков с нерасхождением хромосом и гинандроморфов?

8.6. Существуют ли изоаллели генов, определяющих размер и форму щетинок у дрозофилы? Поясните.

8.7. Какие скрещивания можно поставить с использованием сначала аутосомных аллелей e и e^- , а затем сцепленных с полом аллелей u и u^- , для идентификации гинандроморфов дрозофилы, возникающих в результате двойного оплодотворения одной яйцеклетки?

8.8. Сравните генотипы и фенотипы организмов, мозаичных по половым хромосомам у мух, бабочек и человека.

8.9. «У всех людей во всех соматических клетках имеется одинаковое число хромосом». Какие данные подтверждают такую точку зрения?

8.10. У людей известны следующие типы мозаичности:

| | |
|--------|---------|
| XXX/XO | XXY/XX |
| XX/XO | XXXU/XY |
| XY/XO | |

Каково возможное происхождение каждого из этих типов?

8.11. Возможно ли появление однояйцевых близнецов человека противоположного пола? Поясните.

8.12. Необходимо ли для обнаружения гена существование альтернативного аллеля? Поясните.

8.13. Дайте схематическое изображение тривалента во время синапса, если каждая хромосома несет по одному из трех разных аллелей a^1 , a^2 , a^3 одного гена.

Изобразите схематически хромосомный и генный набор четырех продуктов мейоза, которые должны получиться из нарисованного Вами тривалента.

8.14. Сколько типов яйцеклеток, отличающихся по хромосомному набору, может отложить триплоидная самка дрозофилы, если не учитывать образования хиазм? Сколько типов яиц возникает с вероятностью больше 5%?

8.15а. Сцепленный с X-хромосомой рецессивный ген признака *scurfy* (*sf*.) вызывает гибель самцов мышей до их полового созревания? Как поддерживается линия, в которой имеется этот ген?

8.15б. Иногда в линии, содержащей этот ген, появляются самки с признаком *sf*, которые также погибают, не достигая половой зрелости. Как генетически можно объяснить появление таких исключений? Как можно проверить это объяснение с помощью трансплантации яичников и получения из них потомства?

8.16. Какие можно выдвинуть объяснения, кроме упомянутых выше, изменения с возрастом родителей соотношения полов у потомства?

8.17. Не обнаружено людей с хромосомным набором YO. Можно ли рассматривать такой набор летальным? Если можно, то почему?

8.18. Какие типы зигот образуются у человека в случае нерасхождения X-хромосом у матери? Какие фенотипы должны быть у организмов, развившихся из таких зигот?

8.19. Перечислите характерные причины, вызывающие образование ненормальных типов пола у человека.

8.20. Как можно объяснить тот факт, что известна только одна женщина XO, которая успешно забеременела, тогда как остальные XO стерильны?

8.21. Что можно сказать относительно универсальности теории, объясняющей определение пола соотношением хромосом?

8.22. Почему гинандроморфы дрозофилы не являются интерсексами? Что бывает в таком случае у человека?

8.23. Каков должен быть хромосомный набор триплоидного эмбриона человека «мужского» и «женского» пола?

8.24. У нормальных родителей родился ребенок мужского пола, страдающий гемофилией и синдромом Клайнфельтера. Каковы хромосомные наборы и генотипы родителей и ребенка?

8.25. Была описана белая кошка с одним желтым и одним голубым глазом, пенисом, одним семенником, одним рогом матки и одним яичником. У этого животного имелось 38 хромосом (нормальное диплоидное число), но в некоторых ядрах имелся набор XX, а в других — XY. Какую можно выдвинуть гипотезу для объяснения хромосомного набора этой особи?

8.26. Дайте возможные хромосомные формулы для людей, которые являются:

а. триплоидными мужчинами;

б. мужчинами с синдромом Клайнфельтера.

8.27. У 27-летнего мужчины с некоторой умственной отсталостью имеется набор XYY. По остальным хромосомам он диплоиден. Почему хромосомный набор такого типа встречается весьма редко?

8.28. Встречаются мужчины с синдромом Клайнфельтера и с хромосомным набором XXXYY. Каково возможное происхождение этого набора?

8.29. У насекомого *Protenor* и некоторых короткоусых прямокрылых во всех яйцеклетках имеется одинаковое количество хромосом, тогда как в половине спермиев имеется на одну хромосому меньше. Какова цитогенетическая основа определения пола в этом случае?

8.30. У растений рода *Melandrium* встречаются следующие типы:

| | | |
|--------------|---------------------|---------------------|
| диплоиды: | $XX + 11AA = ♀$ | $XY + 11AA = ♂$ |
| триплоиды: | $XXX + 11AAA = ♀$ | $XXY + 11AAA = ♂$ |
| тетраплоиды: | $XXXX + 11AAAA = ♀$ | $XXYY + 11AAAA = ♂$ |
| | | или |
| | | $XXXY + 11AAAA = ♂$ |

Обсудите цитогенетическую основу определения пола у *Melandrium*.

8.31. Какое соотношение полов можно ожидать у пчелы для оплодотворенных и неоплодотворенных самок?

8.32. Приложима ли гипотеза о том, что пол определяется соотношением генов, к осам-паразитам? Поясните.

8.33. Сравните аллели самостерильности у табака (см. стр. 67) с аллелями, определяющими пол у наездника.

ЛИТЕРАТУРА

- A. D. Bangham. Electrophoretic characteristics of ram and rabbit spermatozoa. — Proc. Roy. Soc., B, 1961, 155, 292.
- C. B. Bridges. Sex in relation to chromosomes and genes. Amer. Nat. 1925, 59, 127. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics, Peters J. A. (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 117.
- R. B. Goldschmidt. Theoretical Genetics. Berkeley and Los Angeles, 1955.
- A. Hannah-Alara. Genetic Mosaics. — Scient. Amer., 1960, 202, 118; Lancet, 1959, I, N 7075, 709.
- V. A. McKusick. Human Genetics. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1964. (В. Мэкивик. Генетика человека. М., изд-во «Мир», 1967).
- L. B. Shettles. Nuclear morphology of human spermatozoa. — Nature, 1960, 186, 648.
- L. B. Shettles. Nuclear structure of human spermatozoa. — Nature, 1960, 188, 918.
- A. H. Sturtevant. A gene in *Drosophila melanogaster* that transforms females into males. — Genetics, 1945, 30, 297.
- P. W. Whiting. Multiple alleles in complementary sex determination in *Habrobracon*. — Genetics, 1943, 28, 365.

СЦЕПЛЕНИЕ И ПЕРЕКРЕСТ МЕЖДУ ГЕНАМИ

В четвертой главе аллельная пара генов, влияющая на характер кожуры семян садового гороха, обозначалась как «гладкая» (R) и «морщинистая» (r). В этом случае использовалась такая система символов, согласно которой для обозначения аллелей берется первая буква (или что-нибудь аналогичное) названия фенотипа (Round — гладкий), обусловленного доминантным аллелем — тем аллелем, который обычно встречается в природе. Доминантный аллель обозначается заглавной буквой, а рецессивный — строчной.

В других системах (см. рис. 9-1) рецессивный аллель обозначается строчной первой буквой названия фенотипа рецессивного признака (wrinkled — морщинистый), w , а доминантный аллель (round) обозначается одним из следующих способов: той же, но заглавной буквой (W); либо той же буквой с верхним индексом $+$ (w^+); знаком $+$ с верхним индексом в виде краткого названия гена ($+$ ^w); либо просто знаком $+$. Далее мы будем в основном пользоваться системой обозначения генов, в которой применяется знак $+$. В такой системе, например, мутантный ген у дрозофилы *зубчатый* (Beadex), который доминирует над своим нормальным аллелем дикого типа, обозначается одной (или двумя) буквами, причем первая берется большой (Bx или $+$ ^{Bx}), а аллель дикого типа обозначается $+$ или Bx^+ . Гибрид $+$ ^w можно изобразить в виде w^+ или w^+ или $+/w$ для того, чтобы показать, что эти аллели располагаются в разных хромосомах гомологичной пары.

Оказалось, что каждая из первых семи изученных пар генов садового гороха расщепляется независимо от других (глава 4). Это можно объяснить тем, что все пары генов располагаются в разных парах хромосом, которых у этого растения как раз семь. Какой же результат получится, если включить в такие исследования восьмую пару генов, в которой имеется доминирование и которая влияет на признак, независимый от предыдущих пар? Если получить дигибрид по одной из семи пар генов и этой восьмой паре, то при его самоопылении в потомстве получается соотношение фенотипов $9 : 3 : 3 : 1$. При анализирующем скрещивании этого же дигибрида с двойным рецессивом соотношение фенотипов потомства равно $1 : 1 : 1 : 1$. Таким образом, оба эти теста показывают, что данные две пары расщепляются независимо друг от друга. Однако, если получить дигибрид по другой паре генов из упомянутой семерки — паре, влияющей на характер поверхности семян — и по той же восьмой паре, соотношение фенотипов в потомстве будет существенно отличаться. Восьмая пара генов определяет наличие или отсутствие усиков (tendrils) нитеподобных органов, служащих вьющимся растениям для прикрепления. Аллель отсутствия усиков рецессивен (t). Когда двойной рецессив — *отсутствие усиков, морщинистые семена* ($wwtt$) скрещивается с двойным доминантом —

РИС. 9-1.

Разные способы обозначения гибрида по генам «гладкий» и «морщинистый»

$$\frac{R}{r} \quad \frac{W}{w} \quad \frac{w^+}{w} \quad \frac{+^w}{w} \quad \frac{+}{w} \quad \frac{+}{w} \quad +/w$$

гладкие семена, наличие усиков $++++$ все F_1 , как и следовало ожидать, обладают усиками и гладкими семенами ($+w + t$). При самоопылении F_1 (дигибрид \times дигибрид) в F_2 получаются следующие результаты:

| Фенотипы | Число растений |
|---------------------------------------|----------------|
| Гладкие семена, наличие усиков . . . | 519 |
| Гладкие семена, отсутствие усиков | 4 |
| Морщинистые семена, наличие усиков | 3 |
| Морщинистые семена, отсутствие усиков | 123 |

Очевидно в F_2 в каждой генной паре произошло расщепление, так как одинаковое соотношение наблюдается между растениями с гладкими и морщинистыми семенами — $323 : 126$ ($3 : 1$) и между растениями с наличием и отсутствием усиков — $322 : 127$ ($3 : 1$). Если бы эти пары генов расщеплялись независимо друг от друга, в итоге получилось бы соотношение $9 : 3 : 3 : 1$. Вместо этого в F_2 встречается слишком много растений с теми же фенотипами, что и у родителей P_1 (с морщинистыми семенами, без усиков и с гладкими семенами с усиками) и слишком мало новых, рекомбинантных типов (с гладкими семенами без усиков и с морщинистыми семенами и с усиками).

Рассмотрим, кроме того, результаты анализирующего скрещивания нашего дигибрида ($+w + t \times ww tt$):

| Фенотипы | Число растений |
|---------------------------------------|----------------|
| Гладкие семена, наличие усиков . . . | 516 |
| Гладкие семена, отсутствие усиков | 9 |
| Морщинистые семена, наличие усиков | 7 |
| Морщинистые семена, отсутствие усиков | 492 |

В случае независимого расщепления получилось бы соотношение фенотипов $1 : 1 : 1 : 1$. Но и теперь подавляющее число гамет, образуемых дигибридом, содержит старые (родительские) комбинации генов ($++$ и wt) и лишь незначительная часть — новые, рекомбинационные наборы генов. Основываясь на результатах этих двух скрещиваний, можно сделать вывод о том, что у данного дигибрида независимое расщепление отсутствует. Сам факт существования некоторого количества рекомбинантов позволяет утверждать, что мы действительно имеем дело с двумя парами разных генов (до сих пор это было лишь предположение).

Предположим, что эти две пары генов расположены в одной паре гомологичных хромосом. Такая возможность уже отмечалась в четвертой главе (стр. 53—54). В этом случае сцеплены друг с другом неаллельные гены, расположенные в одной и той же хромосоме. Вспомним, что при сцеплении с полом наблюдается сцепление определенных генов, например, гена белых глаз дрозофилы, с определенной хромосомой (X-хромосомой). Теперь же мы изучаем сцепление между генами, которое относится ко всем генам, предположительно располагающимся в одной хромосоме. Данные, подтверждающие правильность этого предположения, можно получить только при одновременном изучении трансмиссионной генетики по крайней мере двух признаков. Поскольку не было обнаружено рекомбинантов между генетическим материалом, определяющим пол, и генами X-хромосомы, определяющими независимые от пола признаки (например, цвет глаз), сцепление с полом, а точнее сцепление с X-хромосомой, является абсолютным. Это не дает возможности утверждать, что в X-хромосоме содержится два или большее число отделяемых друг от друга неаллельных генов. В описанных выше опытах с горохом были использованы две пары генов, спо-

собных отделиться друг от друга, на основании этого уже можно выдвинуть гипотезу о том, что в хромосоме содержится более одного гена.

Рассмотрим заново результаты только что описанных скрещиваний гороха. На рис. 9—2 и 9—3 горизонтальные линии изображают хромосомы, буквы указывают на наличие одного из участников каждой пары генов на каждой хромосоме. В тех случаях, когда в данном месте с равным успехом может находиться как доминантный, так и рецессивный аллель, на рисунке ставится вопросительный знак. Изображенные на рис. 9—2 результаты вплоть до генотипов P_2 согласуются с предположением о том, что сцепление абсолютно, т. е. хромосомы, несущие wl и $++$ не изменяются (а если и изменяются, то только за счет мутаций). Однако наличие в F_2 семи рекомбинантных растений говорит о том, что сцепление не абсолютно. Хромосома этих рекомбинантных особей сохранила один старый аллель и получила от гомологичной хромосомы другой не аллельный ген. Более того, дополнительные, реципрокные типы рекомбинантов встречаются примерно с одинаковой частотой. Это наводит на мысль о том, что данные две пары генов поменялись местами на гомологах, т. е. между ними произошел реципрокный перекрест. Поэтому говорят, что рекомбинантные особи несут кроссоверные хромосомы, которые возникли в результате перекреста, или кроссинговера. Таким образом, абсолютное сцепление генов нарушается за счет перекреста, в результате которого получаются генетические рекомбинации или кроссоверы.

Что еще можно выяснить о процессе перекреста и возникающих в результате кроссоверов? Среди потомства, полученного в анализирующем скрещивании дигибрида (рис. 9—3), 16 растений получили от дигибрида кроссоверные хромосомы и 1008 получили неизмененные хромосомы. И в этом случае также реципрокные классы кроссоверов встречаются с одинаковой частотой. Так, на каждые 63 некроссовера приходится примерно один кроссовер. Простой расчет показывает, что результаты по F_2 , изображенные на рис. 9—2, также соответствуют этому соотношению.

P Морщинистые без усиков \times Гладкие с усиками

$$\frac{wl}{wt} \quad \frac{++}{++}$$

F Гладкие с усиками $\frac{++}{wt}$

F_1 F_1 Гладкие без усиков (самоопыление)

$$\frac{++}{wt} \times \frac{++}{wt}$$

| | | |
|-------------------------|-----------------|-----|
| F_2 Гладкие с усиками | $\frac{++}{??}$ | 319 |
| Гладкие без усиков | $\frac{+?}{?+}$ | 4 |
| Морщинистые с усиками | $\frac{w+}{w?}$ | 3 |
| Морщинистые без усиков | $\frac{wl}{wt}$ | 123 |
| Итого | | 449 |

РИС. 9-2.

Сцепление неаллельных генов у садового гороха

P F Круглые с усиками \times Морщинистые без усиков

$$\frac{++}{wt} \quad \frac{wl}{wt}$$

F_1 Круглые с усиками $\frac{++}{wt}$ 516

Круглые без усиков $\frac{+?}{wt}$ 9

Морщинистые с усиками $\frac{w+}{wt}$ 7

Морщинистые без усиков $\frac{wl}{wt}$ 492

Итого 1024

РИС. 9-3.

Сцепление неаллельных генов у садового гороха. Родитель-дигибрид такой же, как F_1 на рис. 9—2.

Эти две пары генов могут также дать дигибрид, который получил один мутантный (рецессивный) и один нормальный (доминантный) аллель от одного родителя ($w+$) и один нормальный и один мутантный ген от другого родителя ($+t$). Если провести анализирующее скрещивание с этим дигибридом, то кроссоверы (wt и $++$) и некроссоверы ($w+$ и $+t$) также будут встречаться в соотношении 1 : 63. Очевидно, что перекрест происходит с постоянной частотой независимо от того, получает ли дигибрид мутантные гены от одного или от двух родителей. Следовательно, в гаметах кроссоверы встречаются с постоянной частотой, не зависящей от того, в каких именно комбинациях особь, образующая эти гаметы, получила рассматриваемые неаллельные гены. Если это действительно так, то даже у особи с генотипом $++/++$ или wt/wt на каждые 64 гаметы должен приходиться примерно один кроссовер, который остается незамеченным, потому что не содержит новых комбинаций неаллельных генов. Обратим внимание, что кроссоверное потомство гораздо малочисленнее по сравнению с некроссоверным. Это значит, что два сцепленных мутантных гена, вместе входя в зиготу, стремятся оставаться вместе и при передаче следующим поколениям (*притяжение*). Если же они входят в зиготу независимо, то наблюдается тенденция к независимой передаче их потомству (*отталкивание*).

У другого вида, душистого горошка, признак пурпурной окраски цветков обусловлен единичным геном ($+$); рецессивный аллель этого гена приводит к образованию красных цветков (r). Удлиненная пыльца ($+$) у этого вида доминирует над круглой пыльцой (ro). При скрещивании чистой линии «пурпурные цветки, удлиненная пыльца» ($++++$) с линией «красные цветки, круглая пыльца» (rro/rro) получается F_1 , в котором встречаются только растения с пурпурными цветками и удлиненной пыльцой ($++/rro$). При самоопылении F_1 в F_2 получается слишком много родительских фенотипов и слишком мало новых рекомбинантных (пурпурные цветки, круглая пыльца и красные цветки, удлиненная пыльца) для независимого расщепления. Поэтому эти две пары генов также должны быть сцеплены. Но, как и в предыдущем случае, сцепление не абсолютно.

Наблюдаемое в данном случае количество кроссоверов получается потому, что P_2 (F_1) дигибрид образует гаметы в соотношении $10++ : 10rro : 1+ro : 1r+$. Такая частота кроссоверов не зависит от того, как гены входят в дигибрид. Заметим, однако, что эта постоянная частота кроссоверов у душистого горошка (1/11) отличается от частоты кроссоверов в описанных выше скрещиваниях садового гороха (1/64).

Рассмотрим еще следующие примеры.

1. Как уже говорилось, у дрозофилы мутантный ген белых глаз (w) сцеплен с X-хромосомой. С ней же, кроме того, сцеплен другой, предположительно неаллельный, мутантный ген укороченных, миниатюрных крыльев (m). Используя чистые линии, можно скрестить белоглазую длиннокрылую муху с мухой, у которой глаза красные, а крылья миниатюрные. F_1 -самки несут две X-хромосомы и представляют собой предположительно $w+/+m$. Затем эти самки скрещиваются и исследуется фенотип потомков мужского пола. [При этом генотип использованных самцов не имеет значения, поскольку любой самец передает своим сыновьям Y-хромосому, в которой отсутствуют аллели рассматриваемых генов. Действительно, оказалось, что в Y-хромосоме отсутствуют аллели почти всех известных генов, расположенных в X-хромосоме, за исключением гена укороченных щетинок, bb (bobbed bristles)]. Кроме того, в Y-хромосоме содержится несколько генов, контролирующих плодовитость самцов, для которых в X-хромосоме нет соответствующих аллелей. Поскольку свою единственную X-хромосому самцы получают от матери, их фенотип прямо указывает, какие именно гемизиготные сцепленные с X-хромосомой аллели они получили. Среди потомков мужского пола в таком скрещивании на два некроссовера приходится примерно один кроссовер.

рис. 9-4
Результ
скрещив
генов че
(a) и за
ев (vg)

2. У
рецесси
отсутст
типом
по одно
что у т
(+h ил
Эти
процент
ных орг
Испос
тела) и
сила сц
Скре
(тело че
при ана
получае
 F_2 хром
ченная с
Посколь
и vg сцеп
 m и w да
различн
негомол
В реп
представ
черное)
зовалось
ваемые
абсолют
Здесь, а
сания ф
При это
ной фор
9 И. Герш

$$P_1 \quad \frac{vg+}{+b} \text{♀} \times \frac{+b}{+b} \text{♂}$$

$$F_1 \quad \frac{vg+}{+b} \text{♂} \text{ и } \text{♀}$$

$$P_2 \quad \frac{vg+}{+b} \text{♀} \times \frac{vgb}{vgb} \text{♂} \quad \text{и} \quad P_2 \quad \frac{vgb}{vgb} \text{♀} \times \frac{vg+}{+b} \text{♂}$$

$$F_2 \quad 40\% \quad \frac{vg+}{vgb}$$

$$F_2 \quad 50\% \quad \frac{vg+}{vgb}$$

$$40\% \quad \frac{+b}{vgb}$$

$$50\% \quad \frac{+b}{vgb}$$

$$10\% \quad \frac{++}{vgb}$$

$$10\% \quad \frac{vgb}{vgb}$$

рис. 9-4.

Результаты реципрокных скрещиваний с участием генов черного цвета тела (*b*) и зачаточных крыльев (*vg*)

2. У человека цветовая слепота (*c*) и гемофилия типа *A* (*h*) обусловлены рецессивными сцепленными с X-хромосомой мутантными генами, которые отсутствуют в Y-хромосоме. Встречаются, хотя и редко, женщины с генотипом $+h/c+$, у которых, следовательно, в каждой хромосоме имеется по одному мутантному гену. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что у таких женщин сыновья-кроссоверы (*ch* или $++$) и некроссоверы ($+h$ или $c+$) встречаются в соотношении примерно 1:9.

Эти примеры говорят о том, что, когда сцепление генов не абсолютно, процент кроссоверов в потомстве для каждого случая постоянен, но, у разных организмов этот процент может быть совершенно различным.

Используя две мутации *Drosophila melanogaster*, *b* (black, черный цвет тела) и *vg* (vestigial, зачаточные крылья), можно проверить, меняется ли сила сцепления у одного организма.

Скрещивание самок $vg+/vg+$ (крылья зачаточные)¹ с самцами $+b/+b$ (тело черное) дает нормальное F_1 $vg+/+b$. Как показано на рис. 9—4, А, при анализирующем скрещивании самок F_1 ($vg+/+b$ ♀ × vgb/vgb ♂) в F_2 получается только 20% потомков с рекомбинантными хромосомами (у всех F_2 хромосома, полученная от отца, несет гены *vgb*, хромосома же, полученная от матери, у 40% несет *vg+*, у 40% $+b$, у 10% $++$ и у 10% *vgb*). Поскольку этот результат не зависит от пола, можно заключить, что *b* и *vg* сцеплены в аутосоме. Вспомним, что сцепленные с X-хромосомой гены *m* и *w* давали 33% кроссоверов. Следовательно, сила сцепления может быть различной для разных пар неаллельных генов, расположенных в разных негомологичных парах хромосом.

В реципрокном скрещивании ($vg+/+b$ ♂ × vgb/vgb ♀) 50% потомства представляет собой $vg+/vgb$ (крылья зачаточные) и 50% $+b/vgb$ (тело черное) (рис. 9—4, Б). Поскольку в этом скрещивании кроссоверов не образовалось, можно сделать вывод о том, что у самцов дрозофилы рассматривалось, можно сделать вывод о том, что у самцов дрозофилы рассматриваемые гены полностью сцеплены. (Если бы и у самок сцепление было абсолютным, у нас не было бы никаких данных о том, что *vg* и *b* могут

¹ Здесь, а также часто в дальнейшем, мы будем придерживаться такого способа описания фенотипа, когда указывается проявление только мутантного признака. При этом подразумевается, что все не упомянутые признаки проявились в нормальной форме.

разделиться и, следовательно, представляют собой два гена, а не один). Более того, оказывается, что все гены, которые частично сцеплены у самок, полностью сцеплены у самцов. Таким образом, у самцов не происходит перекреста, приводящего к образованию кроссоверов¹. Следует отметить, что вообще у животных перекрест подавлен или совсем не происходит у особей гетерогаметного пола. Так, например, перекрест отсутствует у самок птиц.

Какова сила сцепления между данным геном и несколькими неаллельными генами, расположенными в той же хромосоме? Эта проблема просто решается для некоторых сцепленных с X-хромосомой генов у дрозофилы. На табл. 9—1 в одном столбце указаны генотипы самок, а в другом — процент кроссоверов, определенный по фенотипам их сыновей. Приведенные частоты рекомбинаций наблюдаются между геном *желтого цвета тела* (*y*), с одной стороны, и каждым из перечисленных ниже генов, — с другой: *белые глаза* (*w*), *отсутствие поперечной жилки крыльев* (*cv* от *cross-veinless*), *обрезанный край крыльев* (*ct* от *cut*), *миниатюрные крылья* (*m*), *вилчатые щетинки* (*f* от *fogked*). Например, 13 из каждых 100 яиц, отложенных дигетерозиготной по *y* и *cv* самкой, содержат в себе кроссоверы (*++* или *ycv*). Какие свойства мейоза отражают эти значения силы сцепления?

Таблица 9—1

ПРОЦЕНТ КРОССОВЕРОВ МЕЖДУ
ГЕНОМ *y* И СЦЕПЛЕННЫМИ С НИМ
ГЕНАМИ

| Самки | % кроссоверных хромосом <i>y</i> сыновей |
|-----------------|---|
| <i>y+ / +w</i> | 1,5 |
| <i>y+ / +cv</i> | 13 |
| <i>y+ / +ct</i> | 20 |
| <i>y+ / +m</i> | 34 |
| <i>y+ / +f</i> | 48 |

До сих пор мы не делали никаких предположений о том, где и когда происходит перекрест. Поскольку нас интересует полное и частичное сцепление, выявляемое при изучении последовательных поколений, будем рассматривать перекрест лишь в тех клеточных линиях, которые непосредственно дают начало гаметам (*зародышевые клетки*), игнорируя возможность его возникновения в соматических клетках. Хотя перекрест может быть премейотическим, мейотическим или постмейотическим, мы предположим, что все кроссоверы возникают во время мейоза. Ранее (глава 4, стр. 53—54) уже обсуждались генетические последствия обмена (который мы теперь будем называть перекрестом) между двумя парами сцепленных генов, произошедшего во время мейоза. Было высказано предположение, что хиазмы являются цитологическим отражением происшедшего перекреста.

На рис. 9—5 эти цитологические события изображены несколько подробнее, чем это было сделано раньше (рис. 4—8). На стадии I одна из гомологичных хромосом (не закрашена) несет рецессивные аллели *a* и *b*, а другая (закрашена) содержит их нормальные аллели. Черный кружок изображает центромеру. Гомологи вступают в синапсис и образуют тетраду (теперь каждый моновалент представлен двумя *сестринскими нитями*). На стадии II изображена тетрада в дипломе, в которой после перекреста между локусами *a* и *b* (местами хромосомы, в которых располагаются гены) воз-

¹ У самцов дрозофилы изредка происходит «перекрест» особого типа, отличающийся от обычного перекреста у самок.

ника хиазма. Если моноваленты исходно идентичны, хиазма указывает место, где произошел обмен точно эквивалентных сегментов двух несестринских нитей тетрады, причем после обмена длина нитей остается такой же, как до обмена. Стадия III показывает диады после завершения первого деления мейоза. Верхнее ядро содержит одну некроссоверную (+ +) и одну кроссоверную (+b) нить, в то время как нижнее ядро содержит реципрокную кроссоверную (a+) и некроссоверную (ab) нити. На стадии IV изображены четыре гаплоидных продукта (ядра или клетки), которые возникли после того, как диады образовали монады и завершили второе деление мейоза. Согласно этой гипотезе, в результате возникновения одной хиазмы (отмечающей расположение перекреста) в любом месте между локусами a и b два из четырех гаплоидных продуктов мейоза будут содержать некроссоверные, родительские комбинации, а два другие — кроссоверные, неродительские комбинации генов.

Обычно бывает трудно получить данные о том, что кроссоверы, встречающиеся в гаметах, возникают именно таким образом, поскольку у самок только один из четырех гаплоидных продуктов, образующихся из каждой клетки, осуществившей мейоз, становится ядром гаметы, тогда как остальные дегенерируют (в виде ядер полярных тел). Даже в том случае, когда все гаплоидные продукты мейоза становятся гаметами или дают начало гаметам, как в случае образования спермиев или пыльцы, четыре гаметы, происходящие из клетки, содержащей данную хиазму, смешиваются с гаметами, возникающими из других клеток, в которых сходные хиазмы могли быть, но могли и не быть. Поэтому обычно можно обнаружить и идентифицировать только один из четырех продуктов мейоза. Если каждая хиазма возникает в результате предшествующего ей на стадии четырех хроматид перекреста, то следует ожидать появления примерно одинакового количества реципрокных кроссоверов, что, как мы уже видели выше, и наблюдается в действительности. Однако перекрест на стадии I, когда имеются две нити, должен давать такой же результат. Существование некроссоверных типов, которые встречаются с одинаковой частотой и которых больше, чем кроссоверов, можно объяснить, если допустить, что перекрест между локусами a и b возникает либо на стадии двух нитей, причем реже чем в 50% случаев, либо на стадии четырех нитей, причем реже чем в 100% случаев. Морфология хиазмы свидетельствует в пользу того, что перекрест часто, если не всегда, происходит на стадии четырех нитей.

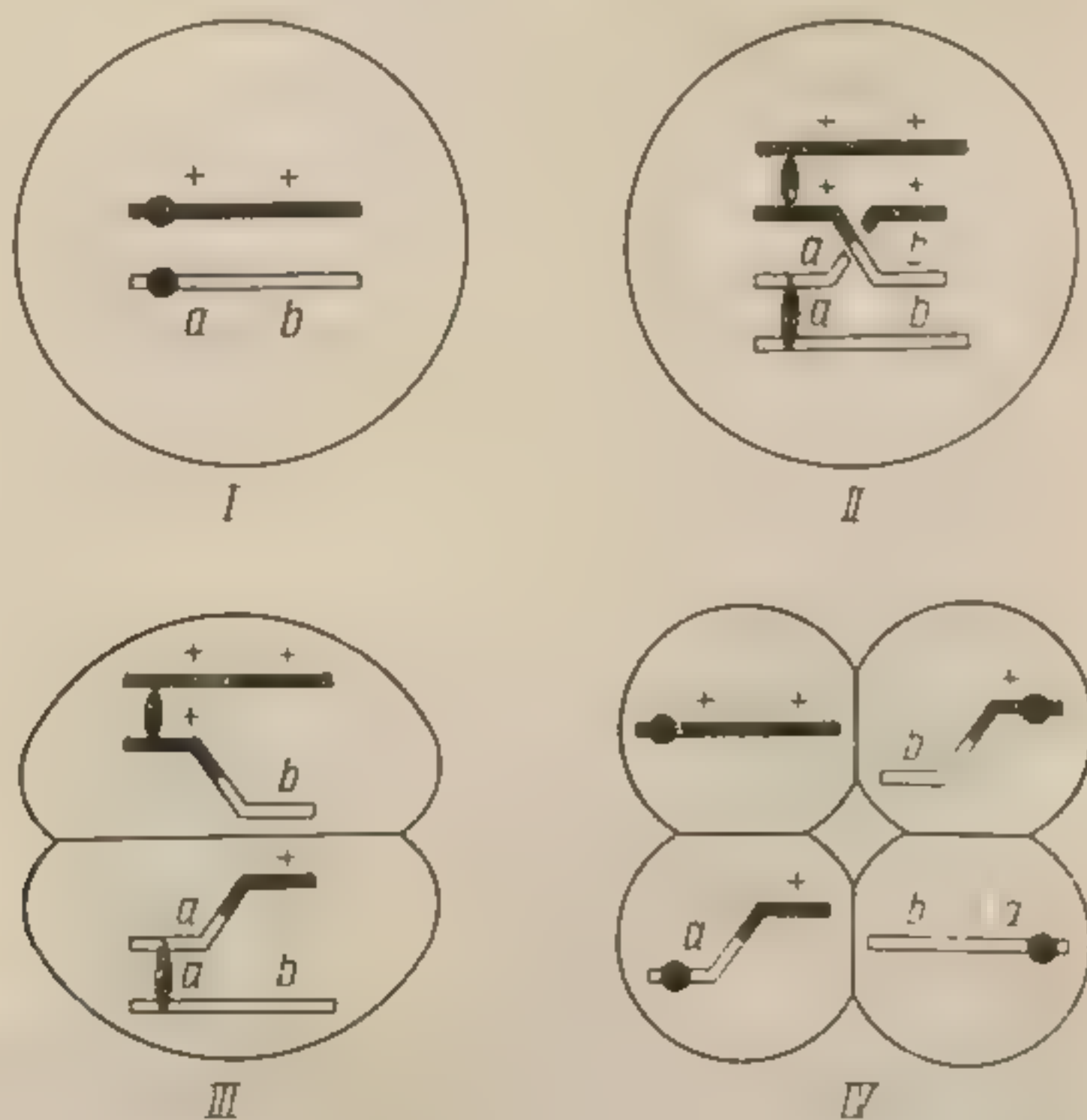


РИС. 9-5

Ожидаемые генетические последствия перекреста между сцепленными генами

Генетические данные о том, на какой стадии — двух или четырех нитей — происходит перекрест, можно было бы получить, если бы гаметы содержали не одну, а две или большее число нитей из данной тетрады. Обнаружение гаметы, несущей некроссоверную нить и гомологичную ей кроссоверную, будет однозначно свидетельствовать в пользу гипотезы о возникновении перекреста на стадии четырех нитей. Подходящая система для такого рода проверки была обнаружена в случае самок дрозофилы, которые обладают двумя нерасходящимися соединенными вместе X-хромосомами и имеющими одну центромеру. Один из типов таких сцепленных X-хромосом в анафазе принимает V-образную конфигурацию. Во время мейоза такие сцепленные хромосомы один раз реплицируются и четыре плеча вступают в синапсис, образуя тетраду. В конце концов, получается два продукта мейоза, каждый из которых содержит по паре сцепленных X-хромосом и два продукта, не содержащих X-хромосом. Если взять самок со сцепленными X-хромосомами, которые были бы дигетерозиготными, и изучить фенотип их потомства женского пола, то иногда оказывается, что одно из плеч сцепленных хромосом является кроссоверным, а другое — нет (рис. 9—6). Хотя эти данные также подтверждают гипотезу о воз-

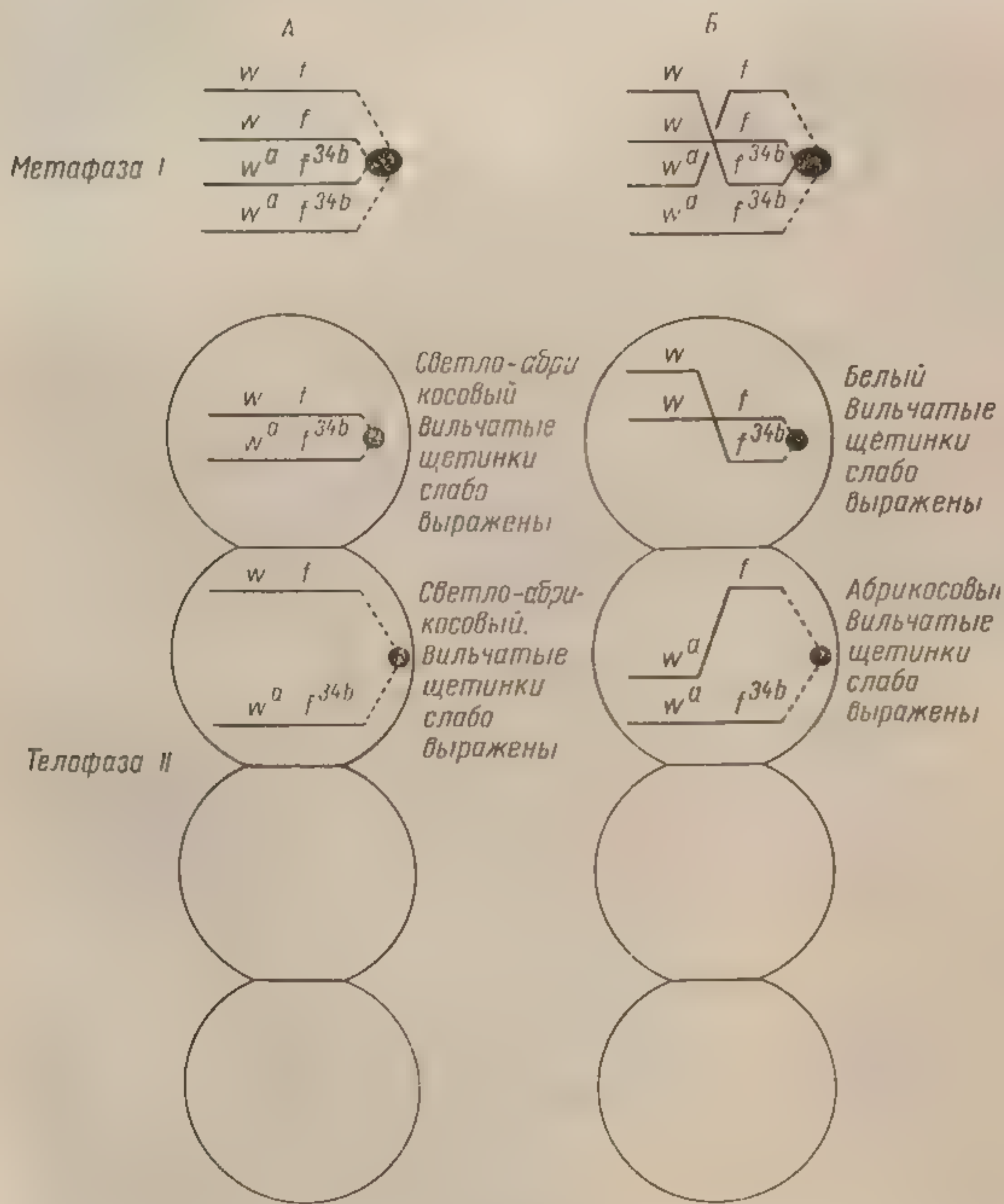


РИС. 9-6.

Генотипические и фенотипические последствия отсутствия перекреста (А) и одного из типов перекреста (В) между маркированными генами у самки дрозофилы со сцепленными X-хромосомами

никновении перекреста на стадии четырех нитей, они не исключают возможности появления его и на стадии двух нитей.

Время возникновения перекреста можно выяснить, изучая красную хлебную плесень нейроспору. Вспомним, что при половом процессе у этого организма образуются так называемые «плодовые тела», состоящие из клеток с двумя гаплоидными ядрами, полученными от разных родителей (рис. 9—7). Два таких гаплоидных ядра сливаются и образуют диплоидное ядро, в котором содержится семь пар хромосом. Затем клетка удлиняется, образуя мешок — аск. Диплоидное ядро немедленно вступает в мейоз, изображенный на рисунке, так что четыре гаплоидных продукта мейоза располагаются друг за другом в цепочку: два верхних ядра произошли из одного ядра, возникшего после первого деления мейоза, нижние два — из второго такого ядра. Поскольку каждое гаплоидное ядро делится еще раз митотически, каждый из продуктов мейоза представлен в аске в двух копиях. Каждую гаплоидную аскоспору можно вынуть из аска, вырастить отдельно и непосредственно определить ее генотип. Следовательно, у этого организма можно получить и идентифицировать все продукты мейоза, возникшие из одного диплоидного ядра.

Используя обозначения рис. 9—5, рассмотрим на рис. 9—8 генетические последствия одного перекреста, возникшего между изучаемыми локусами у нейроспоры. Поскольку мы следим только за одной из семи пар хромосом, все остальные хромосомы на рисунке опущены.

Как видно из рисунка, один перекрест на стадии четырех нитей приводит к образованию двух кроссоверных и двух некроссоверных продуктов мейоза. Перекрест же на стадии двух нитей (в самом верхнем ядре) привел бы к образованию только кроссоверных продуктов.

При изучении большого числа асков определенного дигибрида по сцепленным генам было обнаружено, что в 90% асков все восемь спор не являются кроссоверами, а в остальных 10% точно по четыре из восьми аскоспор являются кроссоверами. Иными словами, все восемь спор из одного аска являются кроссоверами. Этот факт четко показывает, что перекрест происходит только на стадии четырех нитей, как это изображено на рис. 9—9 и 9—10.

Выше уже высказывалось предположение о том, что образование хиазм является нормальной стадией мейоза (стр. 24—25). Хиазмы предотвращают преждевременное расхождение диад, удерживая их в тетраде до анафазы I (обычно в тетраде возникает хотя бы одна хиазма, но может образоваться даже шесть хиазм). Следовательно, перекрест, ведущий к образованию необходимых для клетки хиазм, также является нормальным событием в процессе мейоза.

Поскольку образование хиазм наблюдается в самых разных местах хромосомы, совершенно очевидно, что чем больше расстояние между двумя локусами, тем больше вероятность того, что между ними возникнет

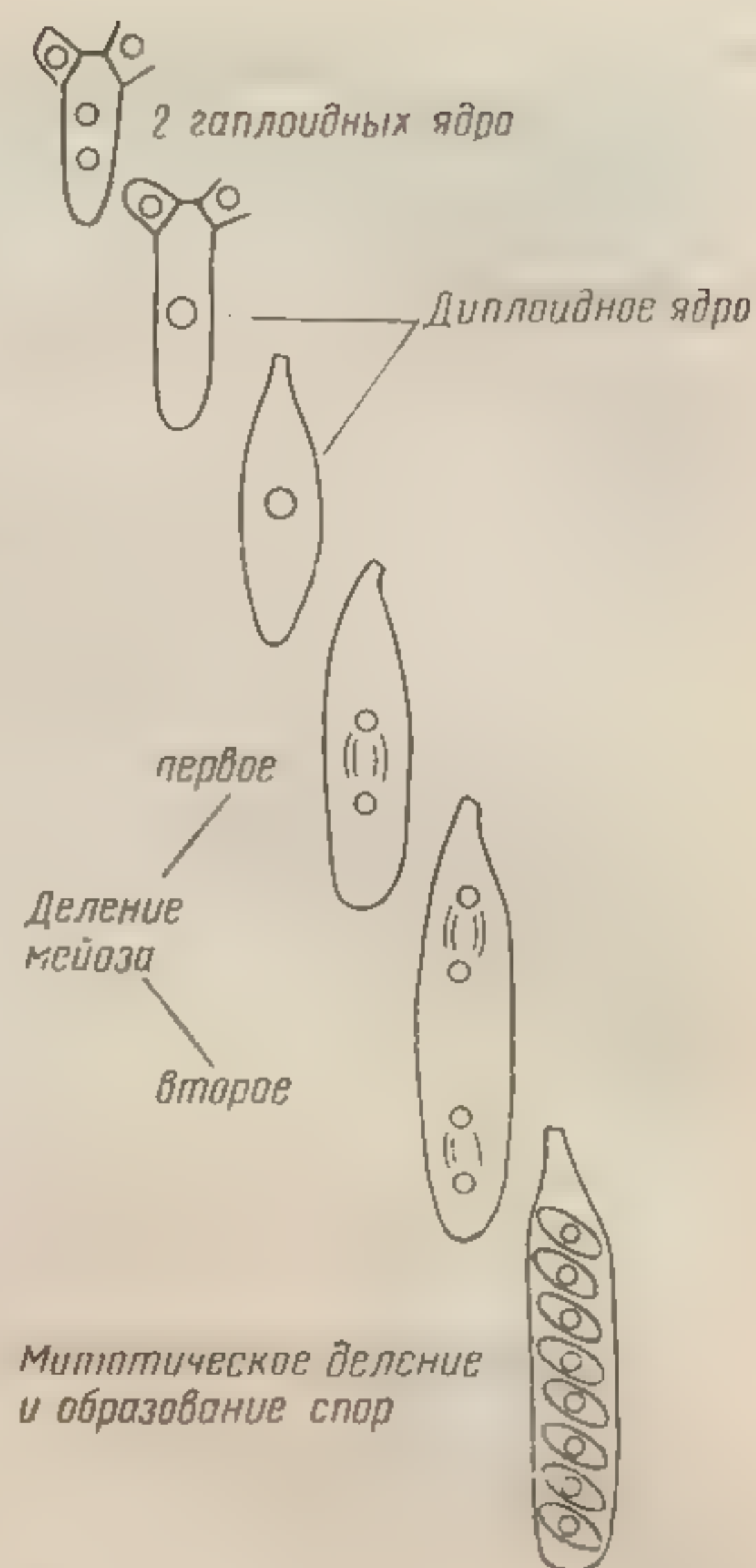


РИС. 9-7.
Мейоз у нейроспоры

перекрест, и, следовательно, тем больше частота кроссоверов по этим локусам. И наоборот, чем ближе локусы располагаются друг к другу, тем меньше вероятность возникновения между ними перекреста и меньше частота кроссоверов.

В соответствии с такой точкой зрения частоту кроссоверов можно использовать как меру относительных расстояний между локусами. (Результаты, представленные на рис. 9—5, приобретают теперь для нас новый смысл.)

В том конкретном опыте с нейроспорой, о котором только что шла речь, в 90% асков в генетически маркированной области хромосомы ($a-b$) не было перекреста. Эти аски дали 90% общего числа образовавшихся спор, содержащих только родительские, некроссоверные генотипы. В 10% асков, в которых прошел перекрест, половина спор оказалась родительского типа, а половина — кроссоверами. Таким образом, если приравнять хиазмы к перекресту, можно утверждать, что 10%-ная частота хиазм приводит к 5%-ной частоте спор, содержащих кроссоверы. Можно приравнять расстояние между локусами a и b пяти кроссоверным единицам длины, где кроссоверная единица длины определяется как такое расстояние между

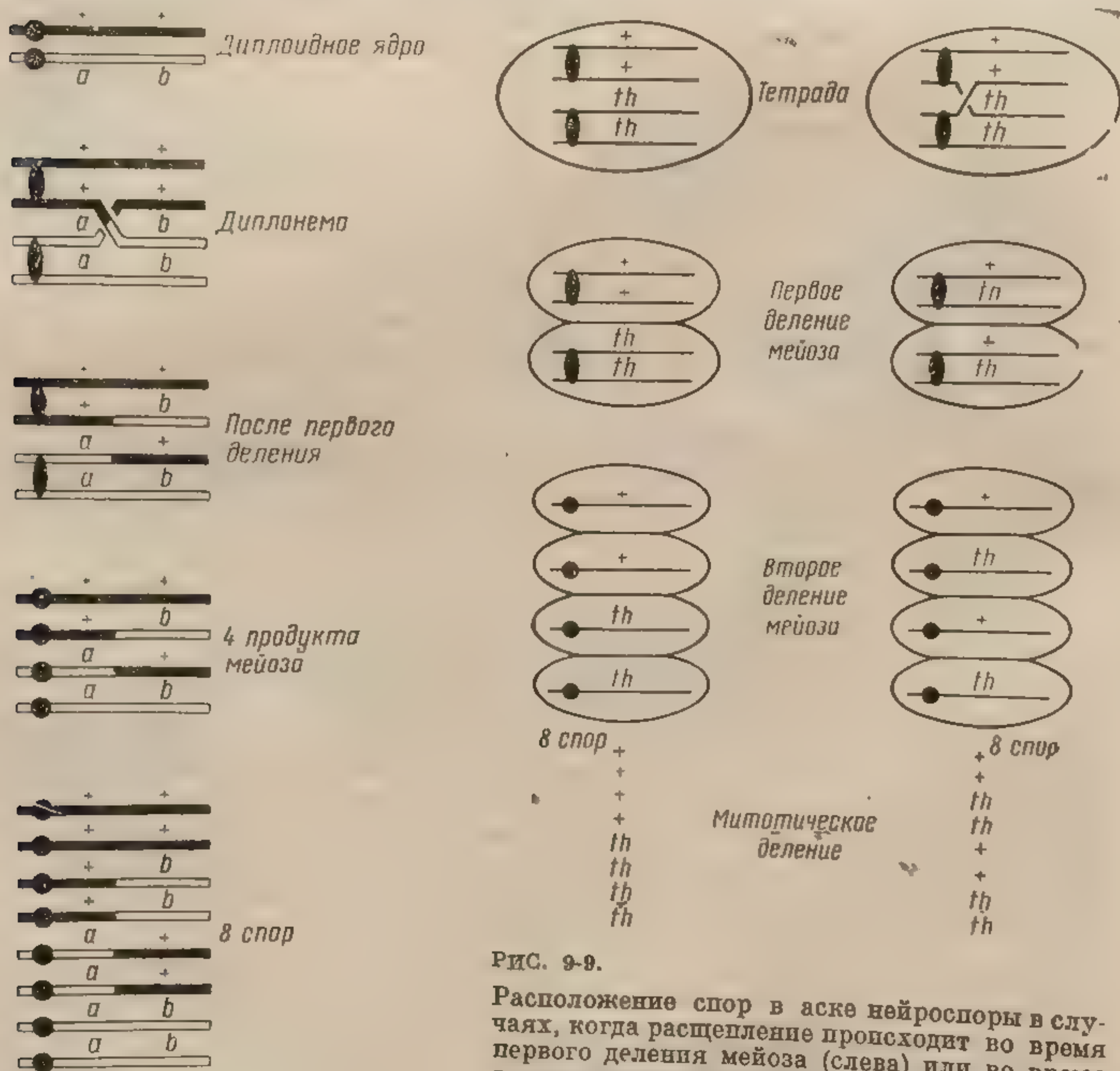


РИС. 9-8.

Хиазма и перекрест у нейроспоры

РИС. 9-9.

Расположение спор в аске нейроспоры в случаях, когда расщепление происходит во время первого деления мейоза (слева) или во время второго деления мейоза (справа)

Время расщепления определено по наличию или отсутствию хиазмы между расщепляющимися генами и центромой

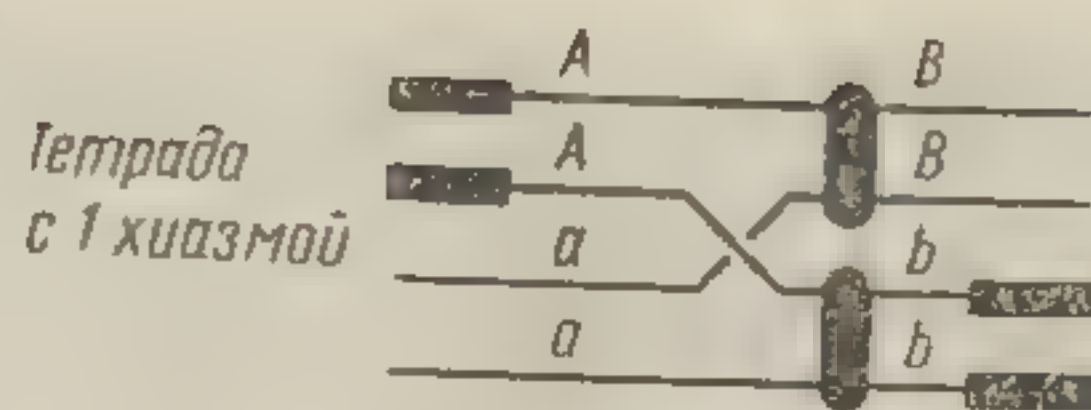
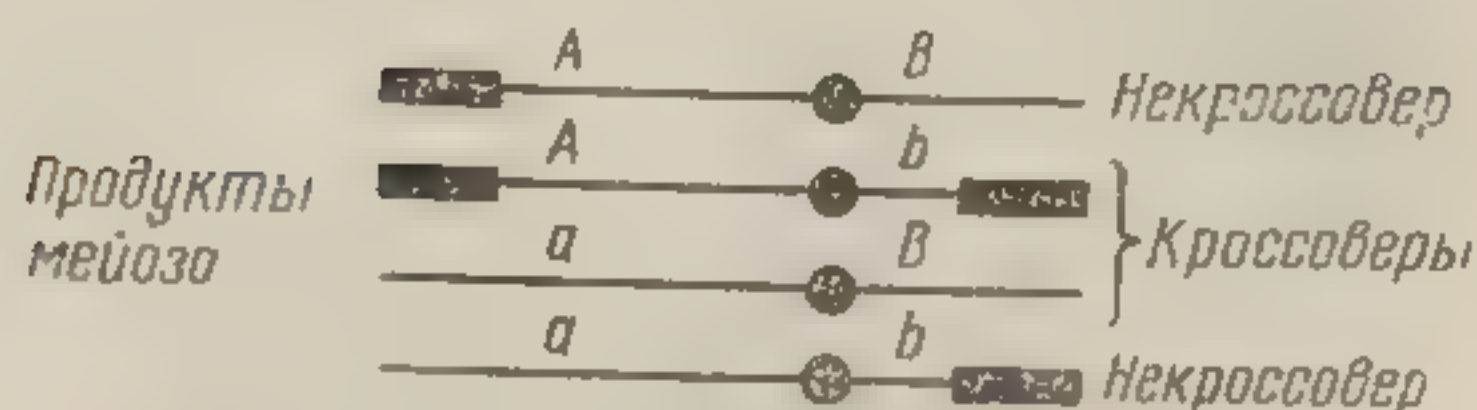


РИС. 9-10.

Связь между генетическими и цитологическими кроссоверами



сцепленными неаллельными генами, на котором возникает один кроссовер на каждые 100 постмейотических продуктов (в нашем случае 100 спор).

Вообще, когда гены располагаются достаточно близко друг к другу (как в данном примере), частота кроссоверов (кроссоверное расстояние) прямо равняется половине частоты хиазм; следовательно, наше предположение, согласно которому каждая хиазма отражает один предшествовавший ей кроссинговер, правильно.

У нейроспоры частоту кроссоверов можно измерить несколькими способами:

1. Проверяются споры из каждого аска (достаточно от двух до пяти спор из каждого аска), для того чтобы проверить, есть ли в данном аске кроссоверы по рассматриваемой области. В приведенном выше примере с областью *a-b* в 10% асков были бы кроссоверы, а в 90% их бы не было. Поскольку каждый аск из первой группы содержит четыре споры-кроссовера и четыре — некроссовера, частота кроссоверов была бы равна 5%.

2. Смешиваются все споры из многих асков, отбирается случайная группа спор, которая затем проверяется. Такой метод также дал бы 5% рекомбинантов по *a-b* области. Этот метод аналогичен определению частоты кроссоверов в спермиях животных.

3. Из каждого аска берется наугад по одной споре, которые затем проверяются. Остальные споры отбрасываются. И в этом случае получается 5% кроссоверов. Такая процедура напоминает то, что естественно происходит у самок многих видов (включая дрозофилу и человека), когда один случайный продукт мейоза входит в яйцеклетку, а остальные дегенерируют.

В приведенных выше примерах не была установлена прямая связь между генетически обнаруженными кроссоверами и цитологическими событиями в определенной области хромосомы. Такое сопоставление невозможно сделать, если оба участника гомологичной пары хромосом цитологически не отличаются друг от друга (как это предполагается на рис. 9—6), поскольку кроссоверная нить, обменявшись цитологически идентичным сегментом со своим гомологом, выглядит так же, как и некроссоверная нить. Однако можно получить такую дигетерозиготу по сцепленным генам, у которой один из гомологов по обеим сторонам от изучаемых локусов отличался бы цитологически от другого. Такая генетическая дигетерозигота одновременно является и цитологической дигетерозиготой, как это показано на рис. 9-10. В этом случае можно отобрать некроссоверных потомков и показать цитологически, что у них всегда сохраняется исходная конфигурация хромосом; напротив, у кроссоверов всегда наблюдается



Исследователи, работавшие с кукурузой в Корнельском университете (1929 г). Слева направо: Бернхем, Родс, Бидл (сидит), Эмерсон и Барбара МакКлинтон

новая конфигурация хромосом, которую можно объяснить взаимным обменом между гомологами определенными областями хромосом. Пользуясь этим методом, точную корреляцию между генетическими кроссоверами и цитологическими обменами показали для дрозофилы Курт Штерн (1931) и Кайтон и МакКлинтон (1931) для кукурузы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неаллельные гены, расположенные в одной хромосоме, сцеплены и имеют тенденцию вместе передаваться следующим поколениям. Точно так же, как сцепление генов является исключением из независимого расщепления, перекрест представляет собой исключение из сцепления неаллельных генов и приводит к тому, что сцепление становится неполным. Неполное сцепление доказывает, что в хромосоме содержится больше одного гена. В каждом данном случае степень неполноты сцепления, мерой которой служит частота кроссоверов, постоянна и не зависит ни от того, какие именно конкретные аллели располагаются в двух разных локусах, ни от того, в каких комбинациях эти аллели вошли в организм, образующий гаметы. Более того, реципрокные типы кроссоверов встречаются с одинаковой частотой. Частота кроссоверов в разных случаях в большой степени варьирует.

Кроссоверная хромосома происходит из тетрады, в которой перекрест между рекомбинировавшими сцепленными генами затрагивает только две из четырех нитей. Для тесно сцепленных генов частота кроссоверов равна половине той частоты, с которой между рассматриваемыми генами возникает хиазма или перекрест.



КУРТ ШТЕРН
в начале 30-х годов

Предполагается, что частота кроссоверов прямо отражает расстояние между генами на хромосоме. Единица кроссоверного расстояния между генами определяется как наличие одного кроссовера на сто постмейотических клеток (спор или гамет).

Поскольку разные гены, сцепленные с одним определенным геном, дают с ним разные проценты перекреста, то, по-видимому, они располагаются на разных расстояниях от него.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

9.1. В чем разница между сцеплением с полом и сцеплением неаллельных генов?

9.2. Доказывает ли сцепление двух пар генов, что они находятся в одной хромосоме? Поясните.

9.3. В чем преимущества и недостатки сцепления и перекреста с точки зрения приспособленности особей с определенным генотипом?

9.4. У дрозофилы гены *y* и *spl* сцеплены с X-хромосомой. Самка, имеющая генотип $++/y\ spl$, дает потомство мужского пола, в котором 3% обладает либо генотипом $y+$, либо $+spl$.

Каковы генотипы гамет, образуемых матерью, и с какой относительной частотой они встречаются? Играет ли здесь роль генотип отца? Поясните.

9.5. Назовите все до сих пор рассмотренные процессы, которые приводят к генетической рекомбинации.

9.6. Считаете ли Вы, что один из основных принципов, установленных в этой главе, состоит в том, что в хромосоме имеется больше одного гена? Поясните.

9.7. Как в свете данных, представленных в этой главе, следует формулировать «закон независимого расщепления»?

9.8. Какие данные свидетельствуют о том, что при перекресте не происходит одностороннего перемещения одного гена с одной хромосомы на другую гомологичную хромосому?

9.9. Всегда ли перекрест приводит к генетической рекомбинации? Поясните.

9.10. Отразилась ли бы на характере изложения принципов генетики в этой книге такая ситуация, при которой первые две пары генов (*Rr*

и Yy), которые одновременно прослеживались в скрещиваниях, оказались сцепленными?

9.11. Допустим, что ген шерстистых волос (глава 3, стр. 46) расположен в аутосоме. Мужчина с нормальными волосами, не страдающий гемофилией, вступает в брак с женщиной с шерстистыми волосами, тоже не страдающей гемофилией. У них рождается сын с шерстистыми волосами и страдающий гемофилией. Каковы генотипы всех трех индивидуумов? Каковы генотипы гамет, обычно образуемых сыном, и каковы их относительные частоты?

9.12. Как Вы докажете правильность утверждения, что перекрест происходит в идентичных точках двух гомологов?

9.13. С какой относительной частотой должны встречаться в потомстве скрещивания двух дрозофил дигетерозигот $vg +/+b$ разные фенотипы и генотипы?

9.14. Скрещиваются две дигетерозиготы дрозофилы $a +/+b$ по двум мутантным генам a и b , сцепленным с аутосомой. С какими относительными частотами должны встречаться разные фенотипы среди F_1 такого скрещивания, если частота некроссоверных яйцеклеток равна $2p$, а частота кроссоверных яйцеклеток равна $1-2p$ и, кроме того, $p < 0,5$?

9.15. Какие результаты получились бы в задаче 9.14 при скрещивании дигетерозигот $ab/+$?

9.16. Самка дрозофилы дикого типа, у отца которой отсутствовала поперечная жилка крыльев, а у матери был желтый цвет тела, скрещивается с желтым самцом. С какими относительными частотами должны появляться в F_1 разные генотипы и фенотипы?

9.17. Скрещивание дрозофил дает указанные ниже результаты. Укажите генотипы родителей и определите, какие гены сцеплены, а какие — нет.

| Сыновья | | Дочери | |
|---|----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 75 дикий тип | 27 зачаточные крылья | 92 дикий тип | 20 белые глаза, зачаточные крылья |
| 70 желтый цвет тела, белые глаза | 2 желтый цвет тела | 75 белые глаза | |
| 21 желтый цвет тела, белые глаза, зачаточные крылья | 1 белые глаза, зачаточные крылья | 28 зачаточные крылья | |

9.18. Какая связь между перекрестом и расщеплением при первом и втором мейотическом делении у нейроспоры?

9.19. У томата ген высокого роста (+) доминирует над геном низкого роста (s) и ген гладкого эпидермиса (+) доминирует над геном шероховатого эпидермиса (r). Скрещивание двух растений дает 208 (высокие, гладкие), 9 (высокие, шероховатые), 6 (низкие, гладкие), 195 (короткие шероховатые). Каковы генотипы родителей?

9.20. Каков процент кроссоверов по двум локусам, если перекрест происходит с одинаковой частотой у особей обоих полов и скрещивание двух идентичных дигетерозигот (Ab/aB) дает четыре типа потомков, обладающих одинаковой жизнеспособностью? Тип, находящийся в меньшинстве, составляет 1% всего потомства.

9.21. Как можно генетически доказать, что последнее деление в аске нейроспоры представляет собой митоз?

9.22. Можно ли было бы при отсутствии кроссинговера выяснить, чем обусловлены альтернативы по двум разным признакам — одной парой генов или двумя сцепленными парами генов? Поясните.

9.23. Нарисуйте сцепленные X-хромосомы дрозофилы, гетерозиготной одновременно по y и m . Какие типы гамет получатся в следующих случаях:

- отсутствие хиазм?
- одна хиазма в сегменте $y - m$?
- одна хиазма вне сегмента $y - m$?

9.24. Допустим, что у одного из представителей гомологичной пары длинных хромосом определенного растения на одном из концов имеется большое утолщение, а у второго представителя этой пары имеется небольшое утолщение на другом конце. Допустим далее, что имеется, кроме того, пара коротких гомологичных хромосом, один из представителей которой оканчивается большим утолщением, а второй — небольшим утолщением на другом конце. Какие комбинации и конфигурации хромосом можно обнаружить в гаметах такого растения?

9.25. Какие доводы можно привести в пользу того, что перекресты, возникающие в зародышевых клетках, не имеют ни премейотического, ни постмейотического происхождения?

9.26. Вычислите расстояние между локусами, определяющими черную окраску тела (b) и короткие крылья (dp , $dumpy$) в кроссоверных единицах на основании следующих результатов скрещиваний дрозофил:

а. P_1 чистая линия, черная \times чистая линия, короткие

P_2 $F_1 \text{♀} \times$ черная, короткие ♂

| | |
|------------------|-----|
| F_2 дикий тип | 272 |
| черная | 774 |
| короткие | 801 |
| черная, короткие | 239 |

б. P_1 черная, короткие \times чистая линия (дикий тип)

P_2 $F_1 \text{♀} \times$ черная, короткие ♂

| | |
|------------------|-----|
| F_2 дикий тип | 360 |
| черная | 103 |
| короткие | 97 |
| черная, короткие | 314 |

9.27. Какие фенотипы и их частоты должны получиться в задачах 9.26а и 9.26б, если провести реципрокное скрещивание для P_2 ?

9.28. Сравните результаты по F_2 в 9.26а статистически с тем, что должно получиться при независимом расщеплении.

9.29. Проверьте, насколько статистически достоверно отличаются результаты в 9.26а и 9.26б.

9.30. Проводится анализирующее скрещивание тригетерозиготы $AaBbCc$ с $aa bb cc$. Результаты, полученные при изучении F_1 , говорят о том, что тригетерозигота образует следующие типы гамет:

| | |
|--------|--------|
| 29ABC | 21abc |
| 235ABc | 215abC |
| 210Abc | 239aBC |
| 27AbC | 23aBc |

- Какие локусы сцеплены и какие расщепляются независимо?
- Напишите генотипы обоих родителей на основании ответа на предыдущий вопрос.
- Укажите процент кроссоверов там, где они имеют место.

ЛИТЕРАТУРА

- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. A Revision of the Standardized Genetic Nomenclature for Mice.— J. Heredity, 1963, 54, 159.
- H. S. Creighton a. B. McClintock. A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1931, 17, 492. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics, J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 155; а так же в «Great Experiments in Biology», M. L. Gabriel and S. Fogel (Eds). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1955, p. 267.
- T. H. Morgan. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance.— Science, 1911, 34, 384. Перепечатано в «Great experiments in biology», M. L. Gabriel and S. Fogel (Eds). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1955, p. 257.
- C. Stern. Zytologisch-genetische Untersuchungen als Beweise für die Morgansche Theorie des Faktorenaustauschs.— Biol. Zbl., 1931, 51, 547.

В пр
от ра
един
опред
дого
гены
К
нить,
ную к
двухм
ник. Д
данны
сцепле
мере
выясн
опреде

РАСПО.

Распол
зую тр
(белые
готных
провест
с соотве
щие кро
ду ш и
ется су
писать
Иными
соверных
рекрест
тельно,
Опре
гена, а т
упомяну
порядке
произвол
На с
у, w, spl
3,0; 13,7
от друга
ствует о
(рис. 10
ко такой
условий.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ, КРОССОВЕРНЫЕ КАРТЫ

В предыдущей главе было показано, что частота перекреста зависит от расстояния между генами, которое можно выразить в кроссоверных единицах. Оказалось, что разные гены, сцепленные с каким-либо одним определенным геном, находятся от него на разных, постоянных для каждого гена *кроссоверных расстояниях*. Рассмотрим теперь, как эти разные гены располагаются в пространстве.

Кроссоверные расстояния можно использовать для того, чтобы выяснить, образуют ли сцепленные гены какую-нибудь правильную трехмерную конфигурацию, например сферу, куб или призму, или какую-нибудь двухмерную конфигурацию, например прямую, окружность или треугольник. Для того, чтобы построить карту расположения генов на основании данных по кроссоверам, т. е. построить *кроссоверную карту*, или *карту сцепления*, необходимо определить кроссоверные расстояния по крайней мере между тремя сцепленными локусами, поскольку для того, чтобы выяснить геометрическое расположение генов, недостаточно двух точек, определяемых кроссоверным расстоянием между двумя генами.

РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ

Расположение сцепленных локусов можно изучать на дрозофиле. Используя три сцепленных с X-хромосомой гена: *y* (желтый цвет тела), *w* (белые глаза), *spl* (расщепленные щетинки), можно получить дигетерозиготных самок следующих типов: $yw/++$; $yspl/++$; $wspl/++$. Если провести анализирующее скрещивание, т. е. всех этих самок скрестить с соответствующими дважды рецессивными самцами, получаются следующие кроссоверные расстояния: между *y* и *w* 1,5; между *y* и *spl* 3,0 и между *w* и *spl* 1,5. Так как кроссоверное расстояние между *y* и *spl* равняется сумме расстояний между *y* и *w* и *w* и *spl*, этим генам можно приписать линейное расположение в следующем порядке $ywspl$ или $splwy$. Иными словами, *генетическая карта, построенная на основании кроссоверных расстояний, линейна*. Если правильно предположение, что перекрест зависит от физического расстояния между генами, то следовательно, гены располагаются в хромосоме линейно.

Определение положения четвертого сцепленного с X-хромосомой гена, а также других сцепленных с ней генов по отношению к трем выше упомянутым генам, показывает, что все они располагаются в линейном порядке (рис. 10--1 и стр. 559). На таких кроссоверных картах локусу *y* произвольно приписывается нулевое положение.

На стандартных кроссоверных картах X-хромосомы дрозофилы гены *y*, *w*, *spl*, *cv*, *ct*, *m* и *f* располагаются соответственно в положениях 0; 1,5; 3,0; 13,7; 20; 36,1; 56,7. Из карты видно, что гены *ct* и *spl* отстоят друг от друга на 17 единиц (20—3). Так как единица длины карты соответствует одному кроссоверу на сто гамет, дигетерозигота по *spl* и *ct* (рис. 10—2) должна дать 17% кроссоверов (8,5% $++$ и 8,5% $splct$). Однако такой результат получается только при соблюдении определенных условий.

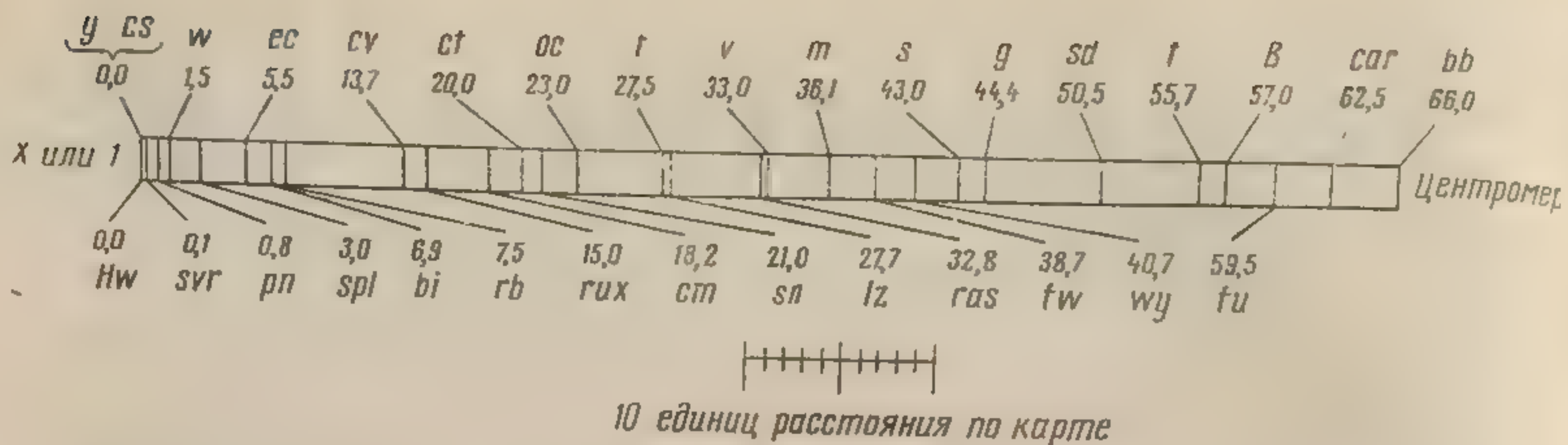


РИС. 10-1.

Кроссоверная карта X-хромосомы *D. melanogaster*

Y (yellow) — желтый цвет тела; Hw (Hairy-wing) — добавочные щетинки на жилках крыльев голове и груди; ac (scute) — уменьшение числа щетинок, особенно скутеллярных; svr (silver) — серебристый цвет тела; pn (prune) — сливовый цвет глаз; w (white) — белые глаза; spl (split) — расщепленные щетинки; ec (echinus) — глаза грубые увеличенные; bi (bifid) — слияние продольных жилок у основания крыла; rb (ruby) — рубиновый цвет глаз; cv (crossveinless) — отсутствие поперечной жилки крыла; rux (roughex) — глаза грубые и уменьшенные; cm (carmine) — карминный цвет глаз; ct (cut) — обрезанный край крыльев; sn (singed) — закрученные [щетинки; oc (ocelliless) — глазки отсутствуют, самки стерильны; t (tan) — смуглый, тело желтоватого цвета; lz (lozenge) — глаза суженные, глянцевиные; gas (gassberry) — малиновый цвет глаз; v (vermillion) — киноварный цвет глаз; m (miniature) — миниатюрные крылья; fw (furrowed) — бороздчатые глаза; wy (wary) — волнистые крылья; s (sable) — соболиновый цвет тела; g (garnet) — гранатовый цвет глаз; sd (scallop) — зазубренные края крыльев; f (forked) — вильчатые щетинки; B (Bar) — полосковидные глаза; fu (fused) — слитые продольные жилки, самки стерильны; car (carnation) — алый цвет глаз; bb (hobbed) — подстриженный, короткие щетинки

Реально наблюдаемая частота кроссоверов зависит от нескольких факторов. Во-первых, от числа особей, составляющих выборку, в которой проверяются фенотипы. В небольших выборках может случайно оказаться, что наблюдаемые значения сильно отличаются в любую сторону от стандартных расстояний на карте. С увеличением размера выборки наблюдаемая величина будет все ближе и ближе приближаться к стандартному расстоянию. Стандартные расстояния, следовательно, можно определить только при проверке большого числа потомков.

Другим фактором, влияющим на наблюдаемую частоту кроссоверов, является неодинаковая жизнеспособность разных фенотипических классов (см. стр. 77): фенотипическое выражение аллеля + обычно бывает более жизнеспособным, чем соответствующего мутантного аллеля. Например (рис. 10—2) сыновья с фенотипом «щетинки расщеплены», «края крыльев обрезаны» обладают меньшей жизнеспособностью, по сравнению с сыновьями дикого типа, и хотя в зиготах оба типа встречаются с одинаковой частотой, первые чаще погибают на ранних стадиях развития и поэтому соответственно реже встречаются при просмотре взрослого потомства. Кроме того, сами зиготы, которые должны дать самцов с расщепленными щетинками или с обрезанными краями крыльев, менее жизнеспособны, чем зиготы, которые должны дать самцов дикого типа. Независимо от того, за каким фенотипом после длительного периода развития проводится наблюдение, значительную часть ошибок, связанных с разной жизнеспособностью, можно избежать, создавая оптимальные условия развития. Другой способ избежать большей части ошибок такого рода — это продлить просмотр кроссоверных фенотипов на одно поколение. Скрещивание ставится таким образом, что особи, за хромосомами которых ведется наблюдение, получают гомологичную хромосому, содержащую нормальные аллели всех генов, по которым изучаются кроссоверы. Поскольку потомство от такого скрещивания фенотипически нормально, жизнеспособность его будет примерно одинаковой, а тип хромосом

у него можно проверить по характеру потомства, которое дадут все особи в индивидуальных анализирующих скрещиваниях. Например, самка на рис. 10—2 скрещивается с самцом дикого типа и дочери F_1 (все фенотипически нормальные) поодиночке скрещиваются с произвольными самцами. Дочери, которые, кроме X-хромосомы дикого типа $++$, полученной от отца, содержат X-хромосому одного из следующих типов: $spl+$; $+ct$, $++$, $spl\ ct$, дадут соответственно потомство мужского пола следующих типов: с расщепленными щетинками, но не с обрезанными крыльями, с обрезанными краями крыльев, но не с расщепленными щетинками; нормальных; с расщепленными щетинками и одновременно с обрезанными краями крыльев. Таким образом, то поколение, которое проверяется на частоту кроссоверов, оказывается в значительной мере защищенным от проявления различий в жизнеспособности, поскольку его генотипы просматриваются в следующем поколении. Для построения карт, а также для других целей, дополнительная работа, необходимая при таком методе, часто оказывается оправданной.

Р. $\frac{spl +}{+ ct}$ ♀ x любой ♂

PHIC. 10-2.

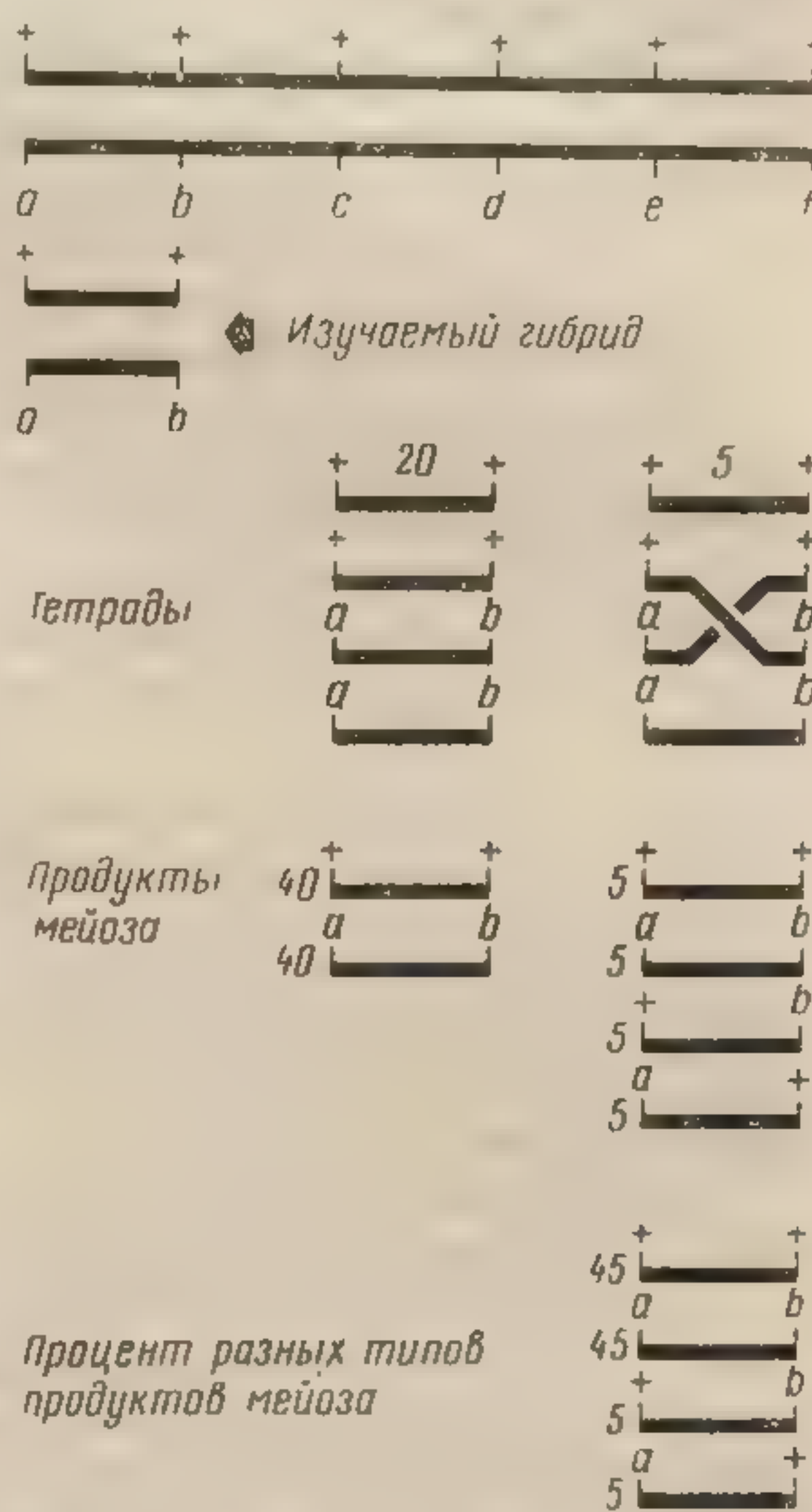


РИС. 10-3.

рами (глава 9). Аналогично в области $b - c$ будет обнаружено 10% кроссоверов. В области $a - c$ хиазма возникнет в 40% случаев и соответственно 20% гаплоидных продуктов мейоза будут кроссоверами по маркерам a и c . Поскольку сумма расстояний между $a - b$ и $b - c$ равна непосредственно измеренному расстоянию между a и c , в этой модели гены должны быть расположены линейно, точно так же, как в эксперименте, ранее описанном в этой главе.

В нашей модели наличие хиазмы в одной области автоматически исключает возникновение хиазмы в другой области. Следовательно, вероятность возникновения хиазмы в области $a - c$ равна сумме вероятностей возникновения ее в области $a - b$ и $b - c$. Это является частным случаем общего правила, по которому *суммарная вероятность возникновения одного (не важно какого именно) события из серии взаимно исключающих друг друга событий равна сумме вероятностей возникновения каждого из них*. Таким образом, вероятность возникновения хиазмы между a и c равна $(20 + 20 + 20 + 20 + 20)\%$, т. е. 100%. В результате в 100% тетрад будет по одному перекресту (т. е. по одной хиазме), что даст 50% кроссоверов. Следовательно, данная модельная хромосома обладает длиной в 50 единиц.

Совершенно очевидно, что эта модель является крайне упрощенной, так как в тетраде обычно содержится больше одной хиазмы. Поэтому возникает вопрос: какие нити участвуют в обмене, когда в тетраде имеется больше одной хиазмы?

Для того, чтобы ответить на этот вопрос, пронумеруем нити тетрады от 1 до 4. Пусть 1 и 2 являются сестринскими нитями с нормальными аллелями, а 3 и 4 сестринскими нитями с рецессивными аллелями (рис. 10—4). Если в области $a - b$ возникла одна хиазма между несестринскими нитями 2 и 3, вторая хиазма между несестринскими нитями в области $b - c$ может возникнуть в результате любого из четырех возможных обменов: 2 с 3; 2 с 4; 1 с 3; 1 с 4. Эти хиазмы изображены на рис. 10—4. Четыре типа единичных хиазм в области $b - c$ вместе с единичной хиазмой в области $a - b$ образуют *двойные хиазмы* следующих трех типов:

Двунитчатые (в обеих хиазмах обмениваются те же самые нити).

Трехнитчатые (одна из двух нитей, участвующих в первой хиазме, принимает участие и во второй. Такая двойная хиазма может образоваться двумя способами).

Четырехнитчатые (во второй хиазме обмениваются те нити, которые не обмениваются в первой).

Рассмотрим генетические последствия этих четырех типов двойных хиазм между несестринскими нитями (изображенных отдельно на левой стороне рис. 10—5). Средняя колонка на рисунке показывает продукты мейоза каждой тетрады, а с правой стороны указано, являются ли эти продукты некроссоверами, единичными кроссоверами или двойными кроссоверами по области $a - b - c$. Два из четырех продуктов мейоза двойной двунитчатой хиазмы являются двойными кроссоверами ($+b+$ и $a+c$) и два некроссоверами ($+++$ и abc). Двойные кроссоверы или, как их иногда называют, «дубли» характеризуются изменением положения среднего гена по отношению к двум крайним. Трехнитчатая двойная хиазма дает один двойной кроссовер, два единичных кроссовера (в каждом из которых меняется положение одного из крайних генов по отношению к двум другим) и один некроссовер. Четырехнитчатая двойная хиазма приводит к образованию четырех единичных кроссоверных нитей. Отметим, что все типы двойных хиазм дают некоторое количество нитей с новыми комбинациями генов, т. е. кроссоверных нитей. Каждый из трех разных типов двойных хиазм дает характерные соотношения разных типов кроссоверов и некроссоверов. Более того, сочетания генов, которые

возникают при каждом типе двойных хиазм, отличаются от тех сочетаний, которые получаются при единичной хиазме (дающей два некроссовера и два единичных кроссовера).

Поэтому на основании генотипов продуктов мейоза можно определить относительные частоты, с которыми встречаются четыре типа двойных хиазм. Возникновение всех четырех типов с одинаковой частотой означает, что нити, образующие одну хиазму, не влияют на нити, образующие соседнюю хиазму. В самом деле, опыты с нейроспорой показывают, что действительно возникают все четыре типа двойных хиазм, причем в некоторых случаях они встречаются с одинаковой частотой. Для наших целей мы можем принять, что обычно при образовании хиазм не происходит *интерференции хроматид*, иными словами на данную хроматиду, образующую хиазму, не влияет несестринская нить, которая может, в свою очередь, образовать хиазму в соседней области. Таким образом, перекрест несестринских нитей в разных местах одной и той же тетрады происходит независимым образом.

Влияет ли наличие одной хиазмы на вероятность образования в той же тетраде второй хиазмы, если считать, что при возникновении двух хиазм нет интерференции между хроматидами?

Допустим, что в генетической системе, изображенной на рис. 10—4, вероятность образования единичной хиазмы в каждой области равна 20%. Тогда, если возникновение хиазмы в области $a - b$ не зависит от возникновения хиазмы в области $b - c$, 20% из 20% тетрад с хиазмой в области $a - b$ будут иметь еще хиазму в области $b - c$, т. е. 4% тетрад будут нести двойную хиазму. (В соответствии с ранее приведенными соображениями среди этих 4% четыре типа несестринских обменов будут встречаться с одинаковой частотой.) Существует общее правило, что *вероятность одновременного возникновения двух или большего числа независимых событий равняется произведению вероятностей их возникновения по отдельности*.

Если бы в $a - c$ области действительно обнаружилось 4% двойных хиазм, можно было бы заключить, что *интерференции хиазм* (или лучше *интерференции перекрестов*) не происходит, т. е. образование одной хиазмы не влияет на образование другой соседней хиазмы. С другой стороны, обнаружение только 2% двойных хиазм означало бы, что имеется некоторая интерференция хиазм.

Степень интерференции хиазм можно выразить в виде отношения:

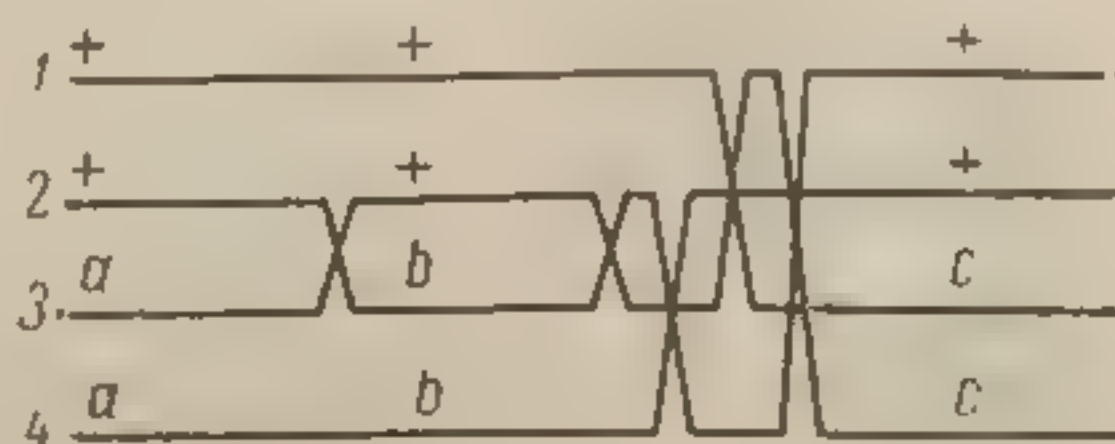
$$\frac{\text{Число наблюдаемых двойных хиазм}}{\text{Число ожидаемых двойных хиазм}} = \frac{0,02}{0,04} = 0,50.$$

Это отношение, называемое *коэффициентом совпадения*, выражает действительную частоту одновременного возникновения двух хиазм. Следовательно, коэффициент, равный нулю, означает, что образование одной хиазмы полностью препятствует образованию второй, а коэффициент, равный 1, означает, что одна хиазма не оказывает никакого влияния на образование второй.

На практике, из-за ряда ошибок при наблюдениях, обусловленных в первую очередь терминализацией хиазм (стр. 29), число и расположение

РИС. 10-4.

Возможные рекомбинации хроматид в результате двойной хиазмы (подробности в тексте)



двойных хиазм обычно не определяют цитологически. Можно ли использовать частоту генетически обнаруживаемых двойных кроссоверов в качестве другого способа измерения интерференции хиазм или перекреста?

Нет сомнений в том, что каждый наблюдаемый двойной кроссовер возник в результате множественного перекреста или множественных хиазм. Ожидаемую частоту двойных кроссоверов в области $a - b - c$ можно подсчитать следующим образом: поскольку в каждой области ($a - b$ и $b - c$) один перекрест возникает с вероятностью 0,2, вероятность двойного перекреста составляет 0,2 от 0,2 или 0,04 (если бы, как и ранее, коэффициент совпадения равнялся 0,5, следовало ожидать, что двойные перекресты будут наблюдаться в 0,02 тетрад). Вспомним, что двойной перекрест может произойти четырьмя способами и может включать 2, 3 и 4 нити тетрады. Если все эти возможности встречаются с одинаковой частотой, только четверть ($4/16$) всех продуктов мейоза с двойным перекрестом будет представлять собой двойные кроссоверы (рис. 10—5). Поскольку остальные три четверти ($12/16$) продуктов мейоза являются некроссоверами или единичными кроссоверами, они не представляют интереса для определения возникновения двойных перекрестов, так как они могли возникнуть и в тетрадах другого типа, например, в таких, где имелся один перекрест или не было ни одного. Соответственно, при частоте двойных перекрестов 0,04 следует ожидать 0,01 двойных

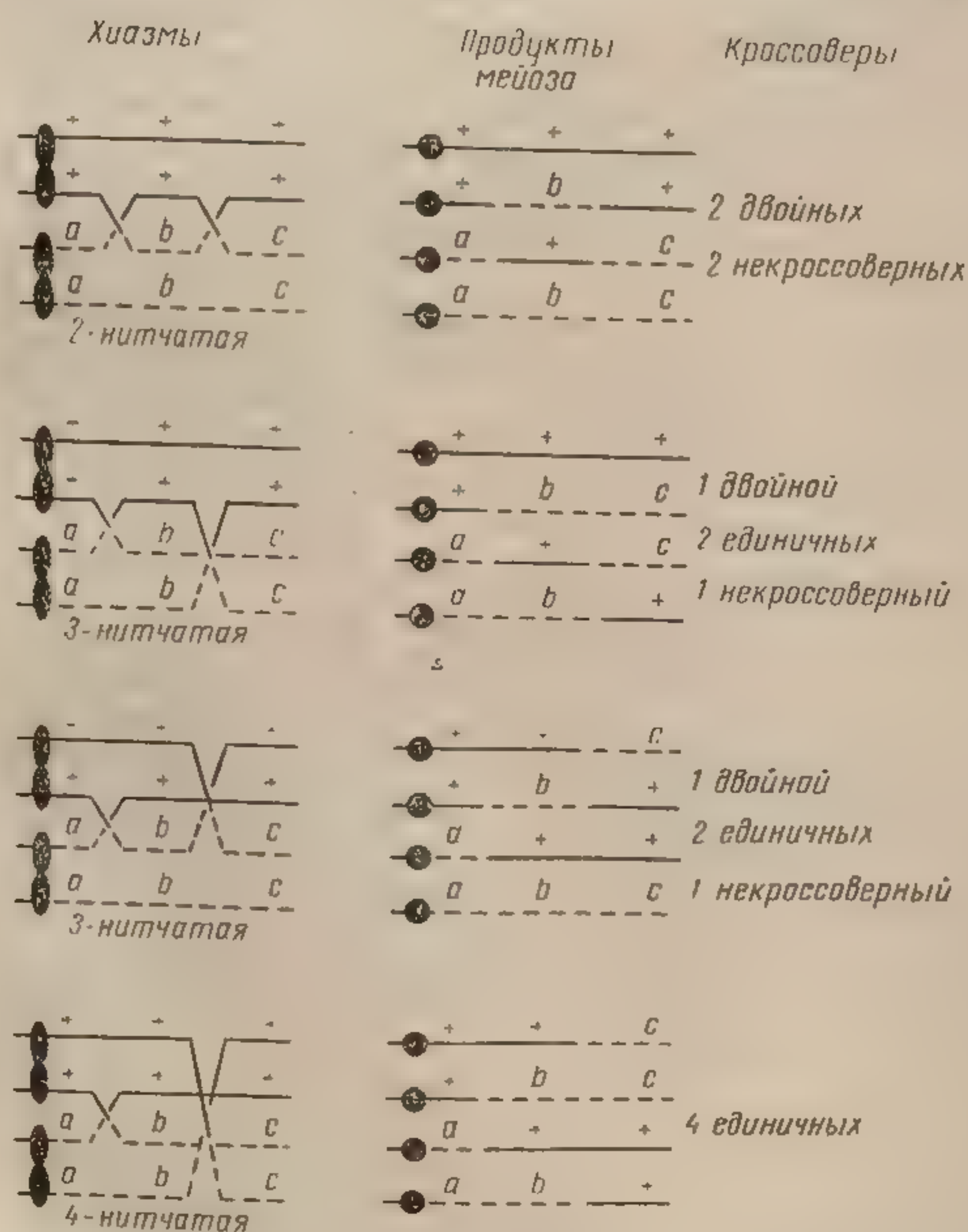


РИС. 10-5.

Различные типы двойных хиазм между несестринскими хроматидами и их генетические последствия

кроссоверов. Если же коэффициент совпадения равен 0,5, то в действительности будет обнаружено только 0,005 таких кроссоверов. Таким способом можно определить коэффициент совпадения, поделив наблюдаемое число двойных кроссоверов на число ожидаемых двойных кроссоверов.

Существует еще один, пожалуй, более простой способ вычисления частоты двойных кроссоверов. В нашем примере вероятность возникновения перекреста равна 0,2 и вероятность того, что данная нить станет кроссовером — 0,5. Вероятность одновременности этих двух событий равна 0,1 и вероятность того, что они дважды возникнут одновременно, равна 0,1 от 0,1, т. е. 0,01. Это значит, что вероятность того, что данная нить будет двойным кроссовером, составляет 1%. Соответственно частота единичных кроссоверов в области $a - b$, умноженная на частоту единичных кроссоверов в области $b - c$, дает ожидаемую частоту двойных кроссоверов (по одному в каждой области). Таким образом, можно легко определить коэффициент совпадения на основании данных по двойным кроссоверам.

Обычно коэффициент совпадения пренебрежимо мал, т. е. практически равен нулю, для небольших расстояний на карте и увеличивается с увеличением расстояния. Такая связь говорит о том, что возникновение одного перекреста в тетраде, вероятно, мешает возникновению поблизости второго перекреста, причем это ограничение ослабевает по мере удаления от места первого. Например, у дрозофилы коэффициент совпадения равен нулю вплоть до расстояния в 10—15 единиц и, следовательно, на таком расстоянии не возникает двойных хиазм (или двойных кроссоверов). Когда же расстояние превышает 15 единиц, коэффициент совпадения постепенно приближается к 1, и тогда уже ничто не мешает образованию двойных хиазм. В хромосомах с равными плечами, по-видимому, нет интерференции в образовании хиазм по разные стороны от центромеры.

Если бы в каждой тетраде была только одна хиазма, максимальная частота рекомбинаций между генами, расположенными на краях, равнялась бы 0,5. Как изменяется частота рекомбинаций между крайними генами, когда в хромосоме имеются двойные хиазмы?

Если бы в каждой тетраде было по две хиазмы, можно было бы думать, что крайние гены должны давать новые комбинации с частотой, превышающей 0,5. Однако при рассмотрении рис. 10—5 выясняется, что, если все четыре типа двойных хиазм возникают одинаково часто, в среднем восемь гамет (единичных кроссоверов) будут содержать новые комбинации по одному из крайних генов и восемь гамет не будут содержать новых комбинаций. Из последних четыре будут некроссоверами и четыре — двойными кроссоверами, в которых средний ген изменил свое положение относительно крайних генов. Следовательно, даже если в каждой тетраде возникнет по две хиазмы, максимальная частота рекомбинаций между крайними генами будет равна 0,5.

Если изучается четыре локуса и в каждой тетраде возникнет по три хиазмы (по одной в каждой области), мы обнаружим, что на каждые 64 продукта мейоза 32 будут рекомбинантами по крайним генам, а 32 ими не будут. Легко подсчитать, что в тех случаях, когда между крайними генами лежит четыре или больше хиазм, частота продуктов мейоза, имеющих нечетное количество кроссоверных областей, равна 0,5. В каждом из этих случаев ген на одном конце перемещается относительно гена, расположенного на другом конце. Однако оставшаяся нить содержит либо четное количество кроссоверных областей (что не приводит к относительному перемещению генов, расположенных на двух концах хромосомы), либо не является кроссовером. Соответственно максимальная частота рекомбинаций между самыми крайними генами (и конечно между генами, лежащими ближе к середине) не превышает 0,5.

Если два гена располагаются на хромосоме достаточно далеко друг от друга, частота рекомбинаций между ними будет близка к 0,5. Поскольку частота рекомбинаций между двумя неаллелями, равная 0,5, свидетельствует о их независимом расщеплении, на основании такой частоты рекомбинаций нельзя утверждать, что данные гены располагаются в одной хромосоме. Соответственно, если две пары генов дают частоту рекомбинаций, близкую к 0,5, они могут либо лежать далеко друг от друга в одной паре гомологичных хромосом, либо располагаться в разных парах гомологов. Однако, если два гена расщепляются независимо, но оба сцеплены с третьим геном, все три гена сцеплены друг с другом.

Всякий раз, когда число изученных пар генов значительно превышает число пар хромосом, число групп сцепленных генов равняется или приближается к числу хромосомных пар. Отсюда следует, что *число групп сцепления ограничено*, и максимальное число этих групп равняется гаплоидному числу хромосом. Позднейшее изучение групп сцепления у садового гороха показало, что два из семи первых изученных Г. Менделем пар генов входят в одну группу сцепления, но далеко отстоят друг от друга. Полученных ранее данных о частоте рекомбинаций было явно недостаточно для принятия гипотезы независимого друг от друга расщепления генов.

Порядок расположения трех сцепленных генов можно определить на основании результатов одного скрещивания. Допустим, что для тригетерозиготы $+++/abc$ проводится анализирующее скрещивание и в потомстве наблюдаются разные фенотипы с частотами, указанными на табл. 10—1 слева. Эти значения, как мы помним, отражают частоты соответствующих генотипов в гаметах тригетерозиготы. Центральное положение занимает тот ген, который реже всего отклоняется от исходных комбинаций генов ($+++$ и abc), поскольку только среднему гену для этого необходимо возникновение двух хиазм. Следовательно, в данном случае таким геном является ген c и в действительности гены располагаются в последовательности acb (или bca). В этих рассуждениях легче разобраться, если рассматривать данные по скрещиванию, когда гены перечисляются в соответствии с их истинным порядком, как это сделано на табл. 10—1 справа.

Таблица 10—1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРЯДКА ГЕНОВ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗИРУЮЩЕГО СКРЕЩИВАНИЯ ТРИГИБРИДА

| | | | |
|-------|-------------|-------|-------------|
| $+++$ | 0,31 | $+++$ | 0,31 |
| abc | 0,31 | acb | 0,31 |
| $+bc$ | 0,14 | $+cb$ | 0,14 |
| $a++$ | 0,14 | $a++$ | 0,14 |
| $++c$ | 0,01 | $+c+$ | 0,01 |
| $ab+$ | 0,01 | $a+b$ | 0,01 |
| $+b+$ | 0,04 | $++b$ | 0,04 |
| $a+c$ | 0,04 | $ac+$ | 0,04 |
| | <u>1,00</u> | | <u>1,00</u> |

Частота кроссоверов, наблюдаемых между локусами a и c , равна 0,30; между c и b — 0,10. Частота единичных кроссоверов между a и b равна 0,36. Однако в частоту кроссоверов между a и b входят и двойные кроссоверы. Поскольку каждый двойной кроссовер состоит из двух единичных кроссоверов между крайними генами, для того чтобы получить суммарную частоту кроссоверов между a и b , частоту двойных кроссоверов 0,02 нужно удвоить и прибавить к частоте единичных кроссоверов. Следовательно, если учитывать двойные кроссоверы, генетическая

карта, построенная на основе частот кроссоверов, становится линейной ($0,30 + 0,10 = 0,36 + 0,04$). Ожидаемая частота двойных кроссоверов составляет 0,3 от 0,1 или 0,03, так что коэффициент совпадения в этом случае равен 0,02, поделенному на 0,03, т. е. 0,66. В примере с областью *uw spl*, который рассматривался ранее в этой главе, самое большое расстояние, *y — spl*, было слишком мало для возникновения двойных перекрестов.

Можно ли на основе данных, представленных на рис. 10—6, построить стандартную карту с указанием расстояний между генами, если предположить, что было просмотрено достаточное количество потомков и соблюдались стандартные условия постановки опыта? Для этого можно использовать расстояние между *c* и *b*, поскольку на таком коротком участке может возникнуть только одна хиазма. Иначе обстоит дело с областью *a — c*, которая в данном опыте оказалась равной 30 единицам. Здесь можно ожидать возникновения двойных хиазм, однако отсутствие маркеров между *a* и *c* не дает возможности их обнаружить. Следовательно, стандартное расстояние между *a* и *c* должно быть больше 30 единиц (*a* расстояние *a — b* больше 40). Отметим, что одна и та же ошибка укорачивает расстояния *a — c* и *a — b*, следовательно для наблюдаемых расстояний *a — c* плюс *c — b* равняется *a — b*. Правильный порядок расположения трех сцепленных генов можно всегда установить, если только два гена находятся на расстоянии меньшем 50 единиц от третьего. Это можно сделать и в том случае, когда хромосома недостаточно помечена генетическими маркерами и в ней нельзя обнаружить все множественные кроссоверные нити.

Отсюда очевидно, почему наблюдаемые частоты кроссоверов для больших расстояний оказываются меньше стандартных расстояний на карте и почему стандартные расстояния на карте всегда получают суммированием коротких расстояний, на которых возможно образование только одной хиазмы.

Хотя крайние гены могут давать не больше 50% рекомбинаций, длина кроссоверной карты может превышать 50 единиц. Например, если данная пара гомологов в среднем содержит две хиазмы в каждой тетраде (см. рис. 10—5), среди 100 продуктов мейоза будет 100 кроссоверов и длина карты будет равняться 100 единицам, хотя крайние гены дадут рекомбинации только в 50% случаев. В общей форме можно сказать, что длина стандартной карты равна среднему числу перекрестов (или хиазм) на тетраду, умноженному на 50.

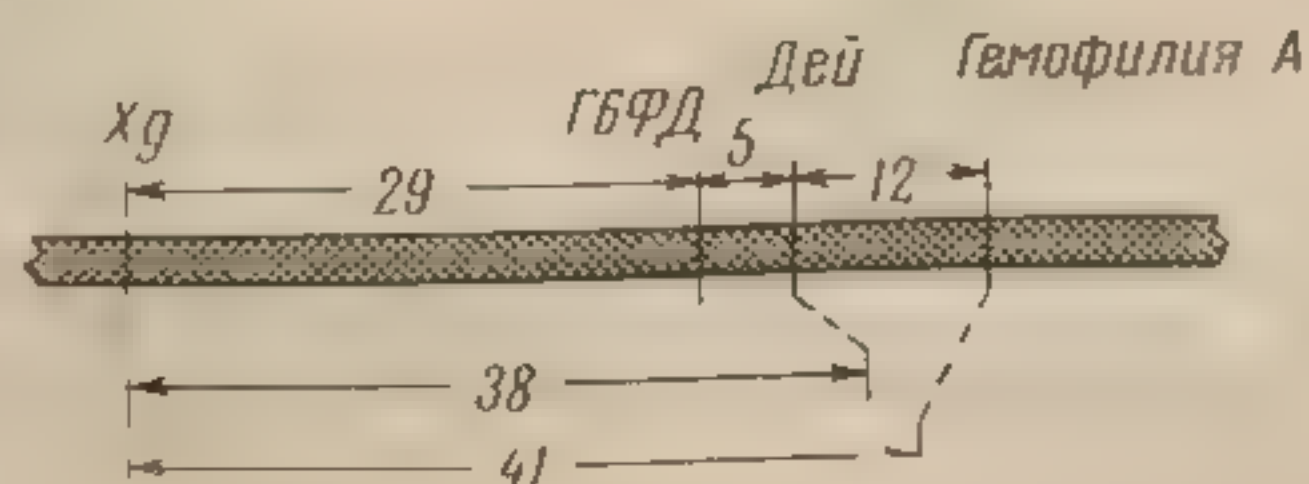
КРОССОВЕРНЫЕ КАРТЫ

На основании частоты кроссоверов были построены генетические карты хромосом многих многоклеточных организмов. На рис. 10—6 по 10—9 изображены карты сцепления для большого числа генов человека, мыши, кукурузы и нейроспоры.

РИС. 10-6.

Карта сцепления участка X-хромосомы человека. Числа — расстояния на карте, определенные в 5 независимых исследованиях.

Изображены следующие локусы: *Xg* (группа крови), недостаточность по Г6ФД (глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа), дейтеранопия (один из видов цветовой слепоты) и гемофилия А.



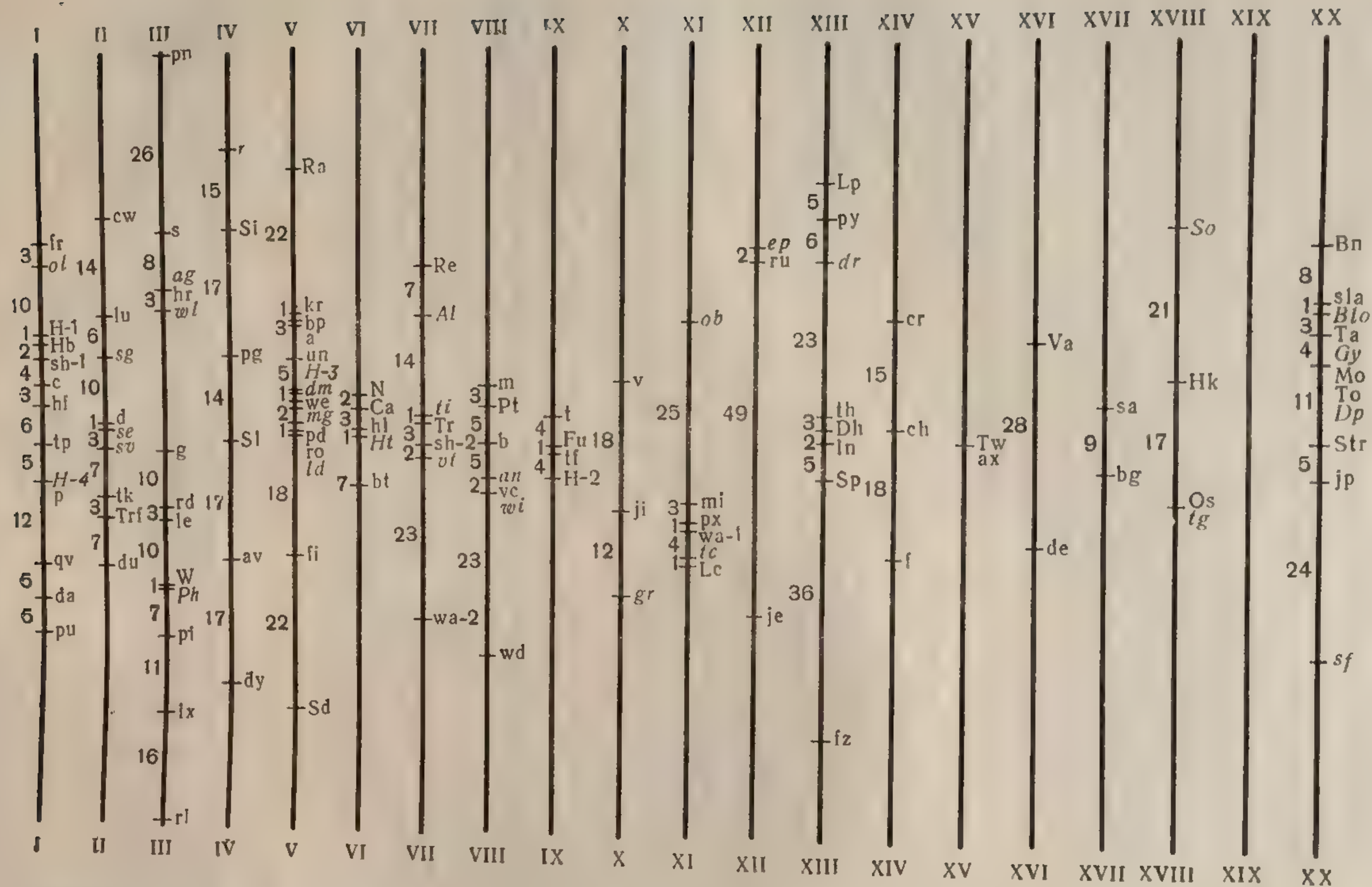


РИС. 10-7.

Группы сцепления у мыши.

Объяснение обозначений генов см. в табл. 10—2

a-серия

| | | |
|----------------------|----------------------|---|
| <i>a</i> | nonagouti | не агути |
| <i>a^e</i> | extreme nonagouti | крайне не агути |
| <i>a^t</i> | black and tan | черные спинка и бока и рыжевато-коричневое брюшко |
| <i>A^w</i> | White-bellied agouti | агути с белым брюшком |
| <i>A^y</i> | Yellow | желтая масть |
| <i>ag</i> | agitans | возбудимость, тремор |
| <i>av</i> | Ames waltzer | танцующие |
| <i>Al</i> | Alopecia | безволосые |
| <i>an</i> | anemia | анемия |
| <i>ax</i> | ataxia | повышенная возбудимость, атаксия |

b-серия

| | | |
|----------------------|--------------|---------------------------|
| <i>b</i> | brown | коричневая масть |
| <i>b^c</i> | cordovan | масть цвета дубленой кожи |
| <i>B^l</i> | Light | светлые |
| <i>bg</i> | beige | бежевая масть |
| <i>Blo</i> | Blotchy | пятнистые |
| <i>Bn</i> | Bent | изогнутый хвост |
| <i>bp</i> | brachypodism | коротконогость |
| <i>bt</i> | belted | опоясанный |

c-серия

| | | |
|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <i>c</i> | albino | альбинизм |
| <i>c^{ch}</i> | chinchilla | шиншилловая масть |
| <i>c^e</i> | extreme dilution | крайнее ослабление масти |
| <i>ch</i> | himalayan | гималайская масть |
| <i>Ca</i> | Caracul | каракулевая масть |
| <i>ch</i> | congenital hydrocephalus | врожденная водянка головного мозга |
| <i>cr</i> | crinkled | безусые |
| <i>cw</i> | curly whiskers | вьющиеся усики |

d-серия

| | | |
|----------------------|-----------------------|--|
| <i>d</i> | dilute | ослабленная масть |
| <i>d^l</i> | dilute lethal | ослабленная масть, летальный |
| <i>da</i> | dark | темный |
| <i>de</i> | droopy-ear | повисшие уши |
| <i>Dh</i> | Dominant hemimelia | множественные нарушения скелета и внутренних органов |
| <i>dm</i> | diminutive | уменьшенные размеры |
| <i>Dp</i> | Dappled | пестрая масть |
| <i>dr</i> | dreher | круговые движения |
| <i>du</i> | ducky | утиная походка |
| <i>dy</i> | dystrophia muscularis | мышечная дистрофия |
| <i>ep</i> | pale ears | бледные уши |
| <i>f</i> | flexed tail | изогнутый хвост |
| <i>fi</i> | fidget | суетливый; встряхивание головой |
| <i>fr</i> | frizzy | вьющиеся усики |

Fu-серия

| | | |
|------------------------|-------|---|
| <i>Fu</i> | Fused | укороченный, изогнутый хвост |
| <i>Fu^{ki}</i> | Kinky | укороченный, изогнутый хвост, аллеломорф <i>Kinky</i> |

Таблица 10—2 (продолжение)

МУТАЦИИ МЫШИ

| | | |
|------------------------|----------------------|---|
| <i>fz</i> | fuzzy | утонченные, вьющиеся волосы |
| <i>g</i> | low glucuronidase | пониженное содержание глюкуронидазы |
| <i>gr</i> | grizzled | седые уши и гениталии |
| <i>Gy</i> | Gyro | круговые движения |
| <i>Hb</i> | Hemoglobin pattern | особенности гемоглобина |
| <i>hf</i> | hepatic fussion | слияние долей печени |
| <i>Hk</i> | Hook | крючкообразный хвост |
| <i>hl</i> | hair loss | безволосый |
| <i>nr</i> -серия | | |
| <i>lr</i> | hairless | безволосый |
| <i>nr^{rh}</i> | rhino | утолщенная морщинистая кожа |
| <i>Ht</i> | Hightail | утолщенный у основания, укороченный торчащий кверху хвост |
| <i>H-1</i> | Histocompatibility-1 | локус гистосовместимости 1 |
| <i>H-2</i> | Histocompatibility-2 | локус гистосовместимости 2 |
| <i>H-3</i> | Histocompatibility-3 | локус гистосовместимости 3 |
| <i>H-4</i> | Histocompatibility-4 | локус гистосовместимости 4 |
| <i>je</i> | jerker | конвульсивные движения |
| <i>ji</i> | jittery | нарушение мышечной координации |
| <i>jp</i> | jimpy | тремор при попытке движения |
| <i>kr</i> | kreisler | нарушения костного и мембранного лабиринта уха |
| <i>Lc</i> | Lurcher | шатающаяся походка |
| <i>Le</i> | light ears | светлые уши |
| <i>ld</i> | limb deformity | деформированные конечности |
| <i>ln</i> | leaden | свинцовая масть |
| <i>Lp</i> | Loop tail | петлеобразный хвост |
| <i>lu</i> | luxoid | полидактилия задних конечностей |
| <i>lx</i> | luxate | полидактилия задних конечностей |
| <i>m</i> | mistry | белые пятна на брюшке, укороченный хвост |
| <i>mg</i> | mahogany | потемнение спины, ушей и хвоста |
| <i>mi</i> -серия | | |
| <i>mi</i> | microphthalmia | нарушения строения глаз |
| <i>M^{rch}</i> | White | белая масть, слабо пигментированные уши |
| <i>Mo</i> -серия | | |
| <i>Mo</i> | Mottled | мозаичная масть |
| <i>Mo^{Br}</i> | Brindled | пятнистый |
| <i>N</i> | Naked | голый |
| <i>ob</i> | obese | тучный |
| <i>ol</i> | oligodactyly | олигодактилия |
| <i>Os</i> | Oligosyndactilism | слияние II, III, иногда всех пальцев конечностей |
| <i>p</i> -серия | | |
| <i>p</i> | pink-eyed dilution | ослабленные, розовоглазые |
| <i>p^d</i> | dark pink-eye | темные, розовоглазые |
| <i>p^s</i> | p-sterile | стерильность |
| <i>pa</i> | pallid | ослабленная пигментация |
| <i>pg</i> | pygmy | карликовость |
| <i>Ph</i> | Patch | пятнистые |
| <i>pi</i> | pirouette | круговые движения |
| <i>pn</i> | pugnose | курносость |
| <i>pt</i> | pintail | узловатый шиловидный хвост |

pu
pr
pu
qr
r
Ra
rd
Re
rl
ro
ru
s
sa
Sd
se
sf
sg
sh-1
sh-2
si
Sl
sla
So
Sp
Str
sv

t-серия
t
T
Ta
tc
ti
tg
th
ti
tk
To
tp
Tr
Trf

Tw
un
v
Va
vc
vt

IV-серия
w
u-a

Таблица 10—2 (продолжение)

МУТАЦИИ МЫШИ

| | | |
|----------------------|------------------------|--|
| <i>Pu</i> | pudgy | укороченное тело и хвост, скелетные аномалии |
| <i>pr</i> | postaxial hemimelia | аномалии передних конечностей |
| <i>pu</i> | polydactyly | полидактилия |
| <i>qv</i> | quivering | локомоторные расстройства, дрожание |
| <i>r</i> | rodless retina | лишенная палочек глазная сетчатка |
| <i>Ra</i> | Ragged | косматый |
| <i>rd</i> | retinal degeneration | дегенерация сетчатки |
| <i>Re</i> | Rex | усатые с волнистой шерстью |
| <i>rl</i> | reeler | расстройства координации движений |
| <i>ro</i> | rough | грубый |
| <i>ru</i> | rubby eye | рубиновые глаза |
| <i>s</i> | piebald | пятнистый |
| <i>sa</i> | satin | атласный |
| <i>Sd</i> | Dauforth's short tail | короткохвостые |
| <i>se</i> | short ear | короткие уши |
| <i>sf</i> | scurfy | покрытые перхотью |
| <i>sg</i> | staggerer | шатающаяся походка |
| <i>sh-1</i> | shaker-1 | круговые движения, повышенная возбудимость |
| <i>sh-2</i> | shaker-2 | |
| <i>si</i> | silver | серебристая масть |
| <i>Sl</i> | Steel | стальной оттенок масти |
| <i>sla</i> | sex-linked anemia | сцепленная с полом анемия |
| <i>So</i> | Sombre | темные |
| <i>Sp</i> | Spotch | пятнистая масть |
| <i>Str</i> | Striated | бородавчатые |
| <i>sv</i> | Snell waltzer | вальсирующие (описаны Снеллом) |
| <i>t</i> -серия | | |
| <i>t</i> | tailless | бесхвостые |
| <i>T</i> | Brachyury | короткохвостые |
| <i>Ta</i> | Tabby | муаровые |
| <i>tc</i> | truncate | укороченный хвост |
| <i>t/</i> | tufted | повторное облысение головы и тела |
| <i>tg</i> | tottering | перемещающиеся расстройства движений |
| <i>th</i> | tilted head | наклоненная голова на одну постоянную сторону |
| <i>ti</i> | tipsy | кроликоподобная шатающаяся походка |
| <i>tk</i> | tail kinks | изогнутый хвост |
| <i>To</i> | Tortoise | черепаховая масть |
| <i>tp</i> | taupe | слегка ослабленная масть |
| <i>Tr</i> | Trembler | дрожащие |
| <i>Trf</i> | Transferrin | локус, контролирующий β -глобулины сыворотки крови |
| <i>Tw</i> | Twirler | кружащиеся |
| <i>un</i> | undulated | волнистые волосы |
| <i>v</i> | waltser | вальсирующие |
| <i>Va</i> | Varitint-waddler | круговые движения |
| <i>vc</i> | vacillans | резко выраженный тремор, шатающаяся походка |
| <i>vt</i> | vestigial tail | рудиментарный хвост |
| <i>W</i> -серия | | |
| <i>w</i> | Dominant spotting | доминантная пятнистость |
| <i>w^a</i> | Ames dominant spotting | доминантная пятнистость |

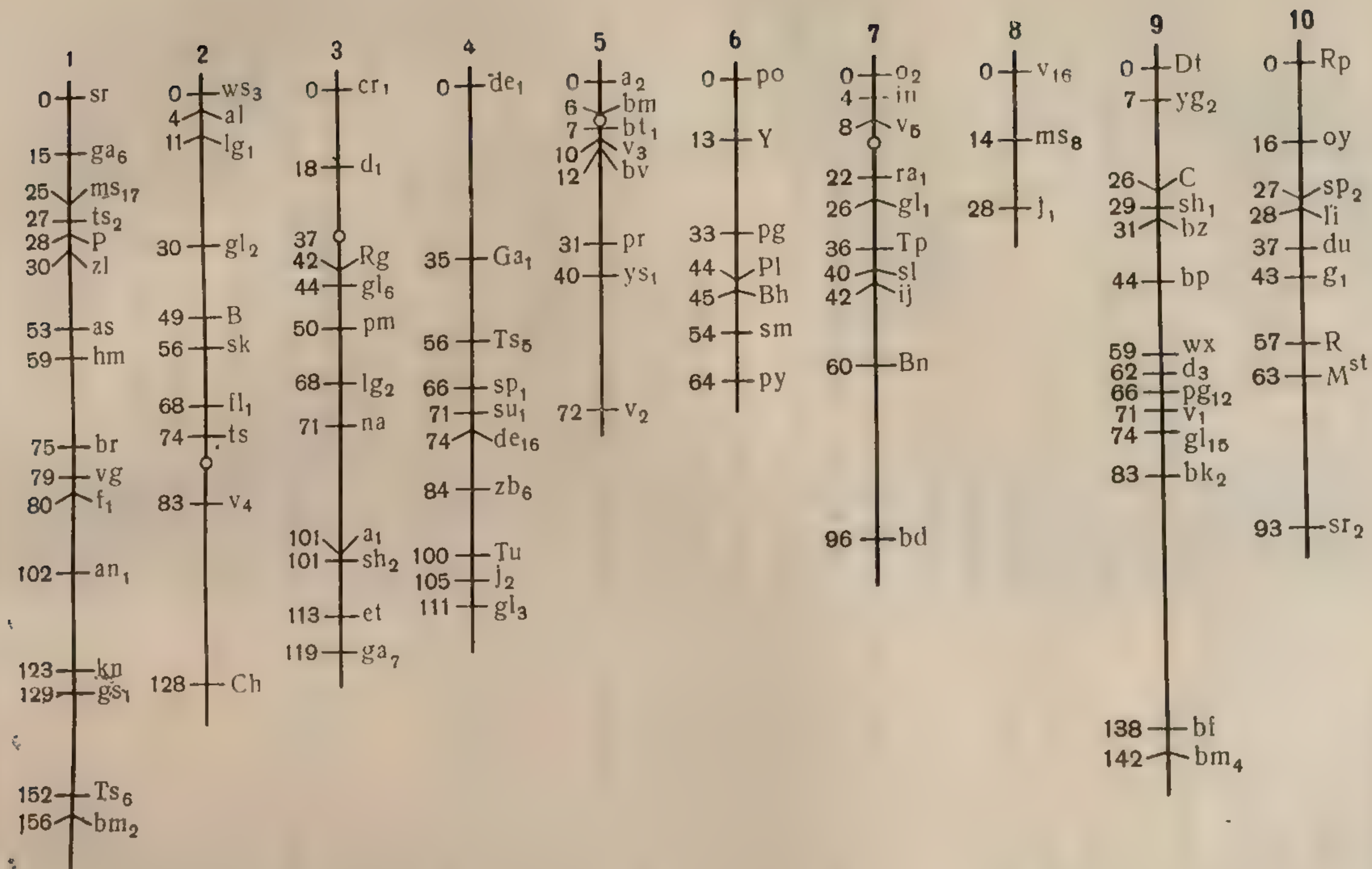


РИС. 10-8.

Группы сцепления у кукурузы. Там, где положение центромер известно, они изображены кружками.
Объяснение обозначений генов см. в табл. 10—3

| | | |
|----------------------|-----------------------|--|
| <i>w^j</i> | Jay dominant spotting | доминантная пятнистость |
| <i>w^v</i> | weaver | нежизнеспособные нарушения в строении мозжечка |
| <i>wa-1</i> | wawed-1 | волнистая шерсть 1 |
| <i>w-2</i> | wawed-2 | волнистая шерсть 2 |
| <i>wd</i> | waddler | расстройство координации передвижения |
| <i>we</i> | wellhaarig | вьющиеся волосы |
| <i>wi</i> | whirler | круговые движения, повышенная возбудимость |
| <i>wl</i> | wabblers-lethal | шатающаяся походка, летальный |

Таблица 10—3

МУТАЦИИ КУКУРУЗЫ

| | | |
|-----------|-------------------------|---|
| <i>a</i> | anthocyanin | антоциановая окраска всех частей растения |
| <i>al</i> | albescent | беловатые листья |
| <i>an</i> | anther ear | развитие пыльников в женских цветках початка |
| <i>as</i> | asynapsis | отсутствие синапсиса |
| <i>B</i> | Anthocyanin booster | усилитель антоциановой окраски |
| <i>bd</i> | branched silkless | ветвистость початка, отсутствие нитей |
| <i>bl</i> | blue fluorescence | |
| <i>Bh</i> | Blotched aleurone | пятнистая окраска алейрона |
| <i>bk</i> | brittle stalk | ломкий стебель |
| <i>bm</i> | brown midrib | коричневая окраска срединной жилки листа |
| <i>Bn</i> | Brown aleurone | желтовато-коричневая окраска алейрона |
| <i>bp</i> | brown pericarp | коричневая окраска перикарпа |
| <i>br</i> | brachytic plant | брахитичный общий вид, укороченные междоузлия, нормальные размеры остальных органов |
| <i>bt</i> | brittle endosperm | сильно сморщенный эндосперм |
| <i>br</i> | brevi plant | короткие междоузлия |
| <i>bz</i> | bronze anthocyanin | бронзовый антоциан |
| <i>C</i> | Aleurone color | один из генов окраски алейрона |
| <i>Ch</i> | Chocolate pericarp | шоколадная окраска перикарпа |
| <i>cr</i> | crinkly leaves | короткий сморщенный лист |
| <i>d</i> | dwarf | карликовое растение |
| <i>de</i> | defective endosperm | недоразвитый эндосперм |
| <i>Dt</i> | Dotted | пятнистость алейрона |
| <i>du</i> | dull endosperm | тусклый эндосперм |
| <i>et</i> | etched aleurone | |
| <i>f</i> | fine striped leaves | альбиностическая полосатость листьев |
| <i>fl</i> | floury endosperm | кремнистый крахмалистый эндосперм |
| <i>g</i> | golden plant | золотистая окраска растения после цветения |
| <i>Ga</i> | Gametophyte factor | ген, действующий на скорость прорастания пыльцевых трубок |
| <i>gl</i> | glossy | глянцевитость проростков |
| <i>gs</i> | green striped leaves | светло-зеленая полосатость между нервами листьев |
| <i>hm</i> | Helminthosporium resis- | устойчивость к Helminthosporium |
| <i>ij</i> | tance iojap stripe | продольная альбиностическая полосатость листьев, начиная со всходов |
| <i>in</i> | intensifier | усилитель красной и пурпуровой окраски алейронового слоя |
| <i>i</i> | japonika stripe | «японская» альбиностическая продольная полосатость листьев |

| | | |
|-----------------------|-----------------------------|---|
| <i>kn</i> | knotted leaf | узловатый лист |
| <i>lg</i> | liguleless | отсутствие язычка |
| <i>li</i> | lineate stripe | тонкая альбинистическая полосатость верхних листьев |
| <i>ms</i> | male sterile | мужская стерильность |
| <i>Mst</i> | Modifier of R st | модификатор R st |
| <i>na</i> | nana plant | маленькое карликовое растение |
| <i>o</i> | opaque endosperm | непрозрачный эндосперм |
| <i>oy</i> | oil yellow | |
| <i>P</i> | Pericarp color | окраска перикарпа и стержня початка |
| <i>pg</i> | pale green | бледно-зеленая окраска |
| <i>Pl</i> | Purple plant color | пурпуровая окраска растения |
| <i>pm</i> | pale midrib | бледная срединная жилка листа |
| <i>po</i> | polymitotic | повышение числа митозов перед образованием половых клеток |
| <i>pr</i> | purpbe aleurone | пурпуровая окраска алейрона |
| <i>py</i> | pygmy plant | мелкое растение |
| <i>R</i> | Anthocyanin | красная окраска алейронового слоя |
| <i>ra</i> | ramosaeal | ветвящийся початок и метелка |
| <i>Rg</i> | ragged leaves | омертвление участков ткани на верхних листьях |
| <i>Rp</i> | Resistance to Puccinia | устойчивость к грибку-паразиту <i>Puccinia sorghi</i> |
| <i>sh</i> | shrunk | морщинистость, вдавленность эндосперма |
| <i>sk</i> | silkless | отсутствие нитей на початке, полное бесплодие початка |
| <i>sl</i> | slashed leaves | разорванные листья у всходов |
| <i>sm</i> | salmon silk color | оранжево-розовая окраска рылец |
| <i>sp</i> | small pollen | мелкая пыльца |
| <i>sr</i> | striate | |
| <i>su</i> | sugary endosperm | сахарный эндосперм |
| <i>Tr</i> | Teopod | сильное развитие колосковых чешуй, женских цветков у основания початка, длинные ножки початков, редукция веточек метелки |
| <i>Ts</i> | Tassel seed | мужские цветки на метелке превращаются полностью в женские, развивается нормальное зерно, растение становится чисто женским |
| <i>ts</i> | tassel seed | сильное развитие колосковых чешуй женских и мужских колосков |
| <i>Tu</i> | Tunicate | позеленение проростков |
| <i>v</i> | virescent | рудиментарные колосковые чешуйки |
| <i>vg</i> | vestigial glumes | восковидный эндосперм |
| <i>ws</i> | white sheath | желтая окраска эндосперма |
| <i>wx</i> | waxy endosperm | желтовато-зеленая окраска растения |
| <i>Y</i> | Yellow endosperm | желтая продольная полосатость листьев |
| <i>yg</i> | yellow green | поперечная зебровидная полосатость листьев |
| <i>ys</i> | yellow stripe | летальность зигот |
| <i>zb</i> | zebra stripe | |
| <i>zl</i> | zygotic lethal | |

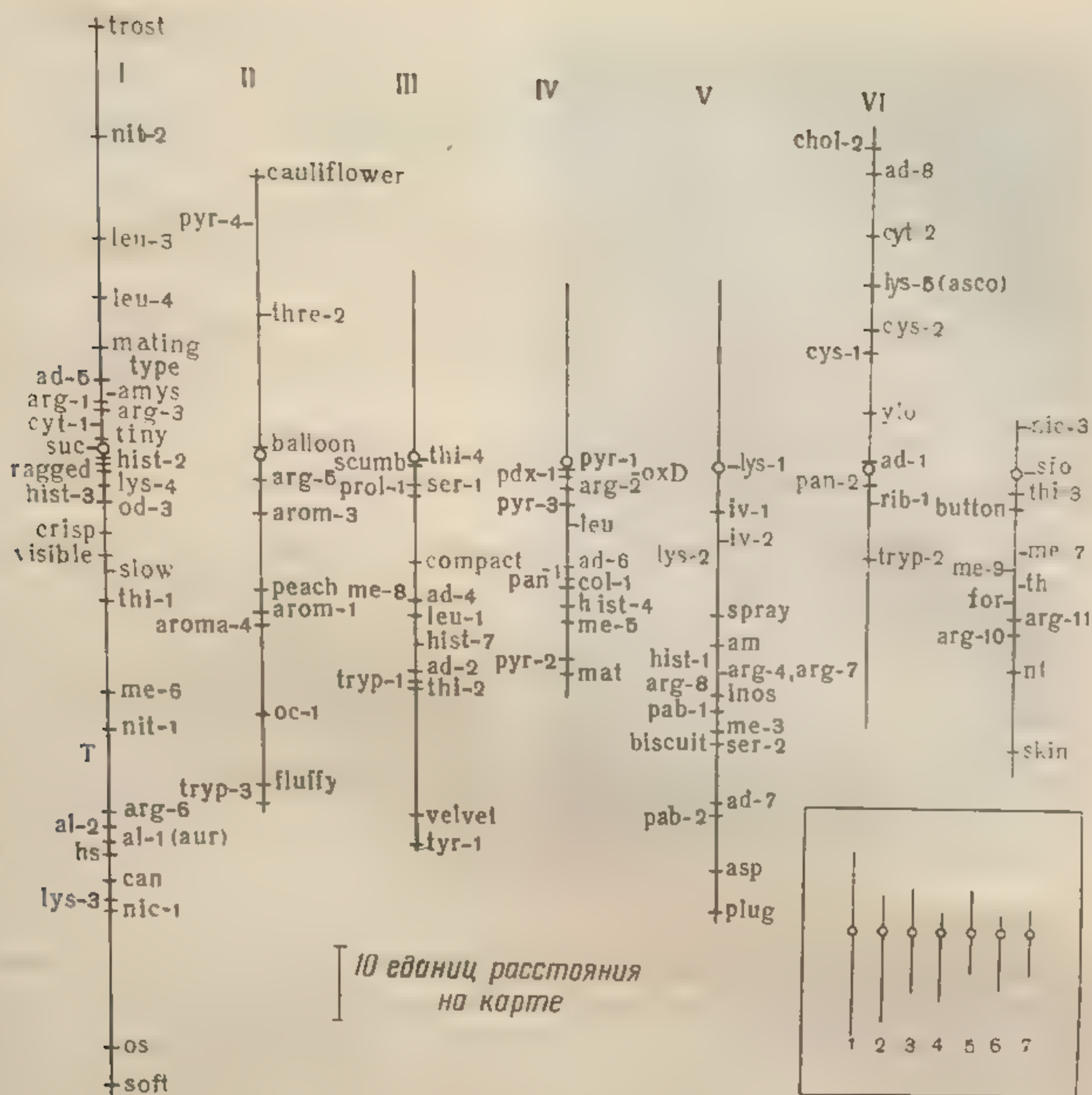


РИС. 10-9.

Группы сцепления у *Neurospora crassa*

Относительные размеры хромосом и центромер (кружки) показаны в правом нижнем углу. Хромосомы и группы сцепления пронумерованы независимо. Расстояния на карте даны приблизительно. Объяснение обозначений генов см. в табл. 10-4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя частоту кроссоверов в качестве меры расстояния между локусами, показали, что гены располагаются в линейном порядке. Наблюдаемые частоты кроссоверов колеблются из-за вариаций как в размере выборки, так и факторов (температуры, возраста, питания, генотипа), влияющих либо на сам процесс перекреста, либо на процессы, протекающие после него (разная жизнеспособность). Стандартные кроссоверные карты строятся при стандартных (оптимальных для перекреста) условиях.

Один перекрест (или хиазма) может интерферировать с возникновением в той же тетраде другого перекреста. Эта интерференция перекрестов или хиазм ослабевает с увеличением расстояния между двумя областями. Когда происходит двойной перекрест, обмен хроматид в одном перекресте, как правило, не влияет на то, какие хроматиды обмениваются во втором. Следовательно, обычно хроматиды не интерферируют друг с другом.

Максимальная частота рекомбинаций между генами, расположенными на концах хромосомы, составляет 50%, независимо от того, сколько хиазм возникает в тетраде. Хотя взаимное расположение генов можно



АЛЬФРЕД СТЕРТЕВАНТ
(1945)

Таблица 10—4

МУТАЦИИ НЕЙРОСПОРЫ. БОЛЬШИНСТВО МУТАЦИЙ КАСАЕТСЯ ФАКТОРОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ РОСТА

| | | | |
|-------------|---|-------------|---|
| <i>a/A</i> | тип скрещивания | <i>nt</i> | никотиновая кислота |
| <i>ac</i> | ацетат | <i>nit</i> | не использует нитраты |
| <i>ad</i> | аденин | <i>nt</i> | никотиновая кислота или триптофан |
| <i>al</i> | альбинизм (белые конидии) | <i>os</i> | чувствительность к высокому осмотическому давлению |
| <i>am</i> | α -аминный азот (недостаточность по глутамат-дегидрогеназе) | <i>ox-D</i> | дефектность оксидазы Д-аминокислот |
| <i>amyc</i> | отсутствие мицелия (ярко выраженный морфологический вариант) | <i>pab</i> | <i>n</i> -аминобензойная кислота |
| <i>arg</i> | аргинин | <i>pan</i> | пантотеновая кислота |
| <i>arom</i> | ароматические аминокислоты (тирозин + фенилаланин + триптофан + пара-аминобензойная к-та) | <i>pdx</i> | пиридоксин |
| <i>asp</i> | аспарагин | <i>prol</i> | пролин |
| <i>aur</i> | золотистые конидии (вероятно аллель <i>al-1</i>) | <i>pur</i> | пиримидин |
| <i>can</i> | устойчивость к канаванину | <i>rib</i> | рибофлавин |
| <i>chol</i> | холин | <i>ser</i> | серин |
| <i>col</i> | морфология колоний | <i>sfo</i> | потребность в сульфонидах |
| <i>cys</i> | цистеин | <i>su</i> | супрессор |
| <i>cyt</i> | измененная цитохромная система | <i>Suc</i> | сукцинат или какое-либо другое промежуточное соединение цикла Кребса |
| <i>for</i> | формиат | <i>thi</i> | тиамин |
| <i>hist</i> | гистидин | <i>thr</i> | треонин |
| <i>hs</i> | гомосерин | <i>tryp</i> | триптофан |
| <i>inos</i> | инозитол | <i>tyr</i> | тирозин |
| <i>iv</i> | изолейцин + валин | <i>T</i> | измененная структура тирозиназы |
| <i>leu</i> | лейцин | <i>val</i> | валин |
| <i>lys</i> | лизин | <i>vis</i> | видимые (название употребляется для многочисленных морфологических мутаций) |
| <i>me</i> | метионин | <i>ylo</i> | желтые конидии |

легко определить при анализирующем скрещивании тригетерозигот, расстояние между двумя маркированными локусами недооценивается, если множественные кроссоверы между ними остаются незамеченными.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

10.1. Является ли факт линейного расположения генов доводом за или против гипотезы о том, что гены располагаются в хромосомах? Поясните.

10.2. Сколько пар генов должны быть гетерозиготными для того, чтобы обнаружить единичный и двойной кроссовер у дрозофилы? у нейроспоры?

10.3. Допустим, пара гомологов у нейроспоры обладает генотипом AB/ab . Нарисуйте аск, содержащий восемь спор, возникших из клетки, в которой:

- а. не было хиазм между этими гомологами.
- б. имелась одна хиазма между центромерой и ближайшей к ней парой генов.
- в. имелась одна хиазма между двумя парами генов.
- г. имелась одна двунитчатая двойная хиазма между двумя парами генов.

10.4. В чем преимущества нейроспоры перед дрозофилой в качестве объекта генетических исследований?

10.5. При каких условиях может произойти расщепление пары аллелей во время первого деления мейоза? во время второго деления мейоза?

10.6. Какие могут быть указания на то, что различная жизнеспособность оказывает влияние на экспериментально измеренные кроссоверные расстояния?

10.7. По скольким сцепленным локусам должна быть гетерозиготна особь дрозофилы или нейроспоры для того, чтобы на основании данных по кроссоверам определить, в линейном или каком-либо ином порядке располагаются данные локусы? Поясните.

10.8. Анализирующее скрещивание показывает, что один из родителей образует следующие типы гамет: 42,4% PZ , 6,9% Pz , 7,0% pZ и 43,7% pz . Перечислите все генетические выводы, какие можно сделать на основании этого результата?

10.9. Проводится анализирующее скрещивание тригетерозиготы $AaBbCc$ с тройным рецессивом $aa\ bb\ cc$. Для фенотипов потомства получились следующие соотношения: abc 64, abC 2, aBc 11, aBC 18, AbC 14, Abc 17, ABc 3, ABC 71.

- а. Какие локусы сцеплены? Почему?
- б. Перепишите генотипы обоих родителей.
- в. Определите наблюдаемые расстояния на карте между всеми парами сцепленных генов.

10.10. Самка дрозофилы с желтым цветом тела, киноварным цветом глаз (*vermilion*) и обрезанными краями крыльев скрещивается с самцом дикого типа. В F_1 все самки дикого типа, а самцы желтые с киноварными глазами и обрезанными крыльями. При скрещивании F_1 между собой в F_2 получают следующие фенотипы:

| | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| 1781 дикий тип | 1712 желтый, киноварный, обрезанные |
| 442 желтый цвет тела | 470 киноварный, обрезанные |
| 296 киноварный цвет глаз | 265 желтый, обрезанные |
| 53 обрезанные края крыльев | 48 желтые, киноварные |

На основании этих данных постройте кроссоверную карту u , v , ct и укажите расстояния между локусами.

10.11. В чем практическое значение линейного расположения сцепленных генов?

10.12. Как можно определить положение центромеры в группе сцепления у нейроспоры?

10.13. При каких условиях все восемь аскоспор из одного аска являются обнаружимыми кроссоверами?

10.14. У кукурузы позеленение проростков, глянцеvitость проростков и варьирующая стерильность обусловлены тремя рецессивами *v*, *gl* и *va* соответственно. Бидл провел анализирующее скрещивание и получил следующие фенотипические результаты:

| | |
|----------------|--------------------|
| 235 нормальных | 270 <i>v gl va</i> |
| 40 <i>va</i> | 48 <i>v gl</i> |
| 60 <i>v</i> | 62 <i>gl va</i> |
| 7 <i>gl</i> | 4 <i>v va</i> |

Постройте кроссоверную карту для этих трех генов и укажите расстояния между локусами.

10.15. Какое влияние оказывают необнаруженные множественные кроссоверы на последовательность маркированных локусов? на наблюдаемые расстояния между маркированными локусами?

10.16. Какие данные можно привести в пользу того, что при перекресте обмениваются сегменты хромосом, а не индивидуальные локусы?

10.17. Разъясните следующее утверждение: частота расщепления пары генов во время первого деления мейоза у нейроспоры обратно пропорциональна расстоянию от центромеры.

10.18. Как можно перевести процент асков, в которых наблюдается расщепление во втором делении мейоза, в расстояние от центромеры?

10.19. У нейроспоры мутант *ag* не способен синтезировать аминокислоту аргинин, а мутант *th* не синтезирует витамина тиамина. Поскольку для выживания необходимы оба эти вещества, объясните, как поддерживается чистая культура *ag th* и как производится проверка наличия таких мутантов.

10.20. Дигибрид по мутантам, описанным в вопросе 10.19, дает аски со следующим порядком расположения спор:

| Число асков | Споры | | | |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 1 + 2 | 3 + 4 | 5 + 6 | 7 + 8 |
| 24 | <i>ag th</i> | <i>ag th</i> | ++ | ++ |
| 27 | ++ | ++ | <i>ag th</i> | <i>ag th</i> |
| 26 | <i>ag</i> + | <i>ag</i> + | + <i>th</i> | + <i>th</i> |
| 23 | + <i>th</i> | + <i>th</i> | <i>ag</i> + | <i>ag</i> + |

Как располагаются эти локусы друг относительно друга и относительно своей центромеры (или центромер)? Как можно определить генотипы этих спор?

10.21. Как располагается мутация *a* на карте относительно центромеры, если нейроспора, гетерозиготная по этой мутации, дает аски со следующим порядком расположения спор:

| Число асков | Споры | | | |
|-------------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 + 2 | 3 + 4 | 5 + 6 | 7 + 8 |
| 44 | <i>a</i> | <i>a</i> | + | + |
| 48 | + | + | <i>a</i> | <i>a</i> |
| 2 | <i>a</i> | + | <i>a</i> | + |
| 3 | <i>a</i> | + | + | <i>a</i> |
| 2 | | <i>a</i> | | <i>a</i> |
| 1 | + | <i>a</i> | <i>a</i> | + |

10.22. Допустим, что после определенного скрещивания у нейроспоры в асках споры расположились в следующем порядке:

| % асков | Споры | | | |
|---------|-------|-------------------|-------------------|--|
| | или { | $\frac{1+2}{7+8}$ | $\frac{3+4}{5+6}$ | $\frac{5+6}{3+4}$ $\frac{7+8}{1+2}$ |
| 92 | xy | xy | ++ | ++ |
| 2 | xy | ++ | xy | ++ |
| 2 | xy | ++ | ++ | xy |
| 1 | xy | $x+$ | $+y$ | ++ |
| 1 | xy | $x+$ | ++ | $+y$ |
| 1 | $x+$ | xy | $+y$ | ++ |
| 1 | $x+$ | xy | ++ | $+y$ |

а. Сцеплены или нет гены x и y ?

б. Если они не сцеплены, то на каком расстоянии от своей центромеры находится каждый ген? Если они сцеплены, постройте кроссоверную карту для x , y и их центромеры.

в. Происходили или нет в данном случае двойные перекресты?

10.23. На рис. 10—10 изображены аски гриба *Sordaria fimicola*. Аски находятся на разных стадиях созревания. Самые зрелые содержат темные споры. Какие генетические выводы можно сделать на основании этой фотографии, если известно, что все клетки — родоначальницы этих асков — обладали одинаковым генотипом?

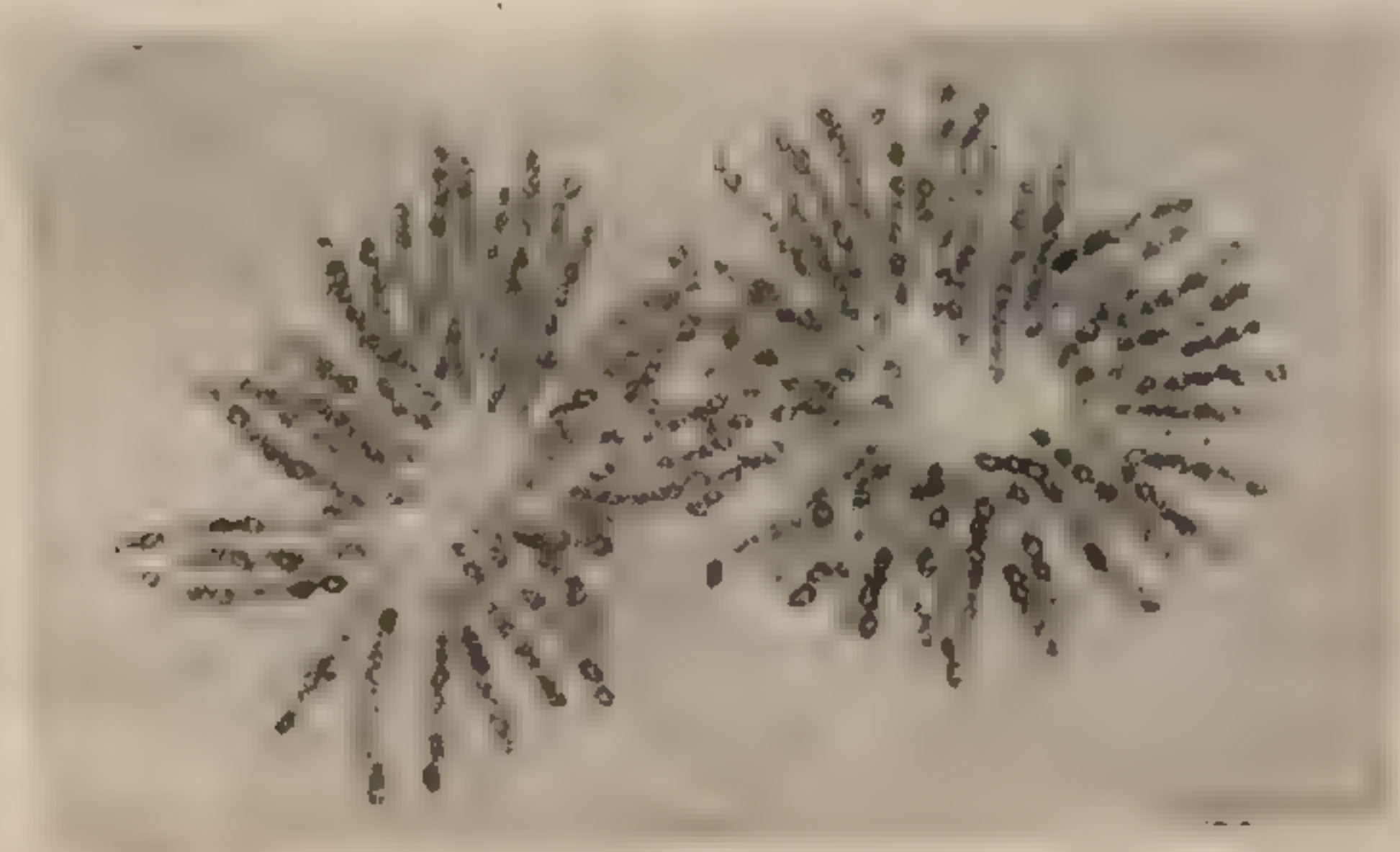


РИС. 10-10.

Аски *Sordaria fimicola*.

ЛИТЕРАТУРА

- R. W. Barratt, D. Newmeyer, D. D. Perkins a. L. Garnjobst. Map construction in *Neurospora crassa*. — Advances in Genet., 1954, 6, 1—93.
- R. A. Emerson, G. W. Beadle a. A. C. Fraser. A summary of linkage studies in maize. — Mem. Cornell Univ. Agric. Stat., 1935, 180.
- K. R. Lewis a. B. John. Chromosome Marker. London J. and A. Churchill, Ltd., 1963.
- A. H. Sturtevant. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. — J. Exper. Zool., 1913, 14, 43. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs Prentice-Hall, 1959, p. 67.
- См. Приложение II.

ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛА ХРОМОСОМ

В предыдущих главах, за исключением глав 6 и 8, была сделана попытка определить свойства генетического материала по данным о процессе генетической рекомбинации. Этот процесс позволил выявить существование различных единиц рекомбинации генетического материала, включающих, в порядке уменьшения размеров, геном, хромосому и гены в хромосоме — и как наименьшую единицу рекомбинации — *рекомбинационный ген*.

Этой главой начинается изучение генетического материала по данным о процессе мутирования. Мы специально постараемся изучить, до какого предела можно разделить генетический материал на мутирующие единицы, все время имея в виду, что единицы мутации и рекомбинации в одних случаях могут быть идентичными, а в других — нет.

Мы смогли изучить рекомбинационные свойства гена только потому, что он оказывает обнаружимое влияние на фенотип и существует в альтернативном состоянии. Легко видеть, что если бы ген находился во всех организмах в одной и той же форме, то его нельзя было бы обнаружить, так как все особи имели бы один и тот же генотип, и, следовательно, обнаруживали один и тот же диапазон фенотипического выражения. Другими словами, до сих пор в этой книге шла речь только о тех генах, которые встречаются либо в различном числе у разных особей, либо имеют альтернативный аллель, причем соблюдалось одно условие, а именно: такое генетическое различие приводит к обнаружимому изменению фенотипа.

Среди живых организмов генетические различия такого рода огромны. Мы уже видели, что некоторая определяемая генами изменчивость фенотипа обусловлена разделением полов, в результате чего посредством расщепления, перекреста и оплодотворения образуются новые комбинации уже существовавших генов. Эти механизмы рекомбинации перемешивают гены, подобно тому как тасование колоды игральных карт приводит к огромному количеству комбинаций.

ОБНАРУЖЕНИЕ МУТАЦИЙ

Мы хотим ответить на два вопроса относительно генетических различий: что они собой представляют и как они возникают? Для этого нам нужно сначала суметь отличить мутанта — действительно новую генетическую форму, получившуюся в результате мутации — от рекомбинанта по уже существовавшим генам. Чтобы показать, как можно провести такой анализ, можно использовать пример с *Drosophila*. Предположим, что в лабораторных линиях нет мух с придатком в переднедорзальном углу торакса. Затем появилась одна-единственная муха с придатком в этой части тела (рис. 11—1); такой признак обнаруживается примерно у половины потомства, полученного от скрещиваний этой мухи с диким типом любой другой линии (ауткросс). Как следует объяснять появление этого нового фенотипа («шестикрылая» дрозофила)?

Если условия выращивания не менялись, то фенотип *Hexaptera* не может быть обусловлен только одними внешними факторами. Может

РИС. 11-1.

Фенотип «шестикрылый»
(Hexaptera) у *D. melanogaster*.



ли фенотип Hexaptera появиться в результате новой комбинации уже существовавших генетических единиц? Его появление не может быть обусловлено взаимодействием двух определенных аллелей, уже имевшихся в популяции, которые при оплодотворении случайно попали в одну зиготу, так как такое сочетание должно бы было складываться редко, и после расщепления нельзя бы было ожидать появления этого фенотипа у сколько-либо заметного количества потомства, получаемого при ауткроссе. Более того, его появление не может быть обусловлено и редкой комбинацией уже существовавших несцепленных неаллельных генов, так как в последнем случае не более четверти потомства имело бы новый фенотип. Следовательно, появление Hexaptera не может быть связано с расщеплением. Такой новый фенотип мог бы появиться в результате редкого перекреста между двумя очень тесно сцепленными локусами, так что два ранее разделенных неаллельных гена оказались в одной хромосоме. Возникнув однажды, такое новое сочетание сцепленных генов оставалось бы почти всегда интактным и должно было бы передаваться половине потомства. Предположим, однако, что хромосомы родителей были соответствующим образом маркированы и оказалось, что в участке хромосомы, существенном для образования нового фенотипа, перекреста не было. В таком случае полученный результат не объясняется также и перекрестом.

Единственное остающееся разумное объяснение должно заключаться в том, что в генетическом материале произошло совсем новое изменение — мутация. Если мутация доминантно влияет на фенотип, то не трудно определить, обусловлен ли новый фенотип мутацией или генетической рекомбинацией.

В случае доминантной мутации для появления у потомства доминантного мутантного признака необходимо, чтобы только один родитель имел специфический генотип; в качестве предпосылки для появления этого признака не нужна какая-либо особая генетическая рекомбинация. В других случаях новый фенотип появляется у потомства, только если оба родителя имеют особые генотипы, и для его появления необходима

генетическая рекомбинация. Отметим, что обнаружить полностью рецессивный аутосомный мутантный ген можно только через столько поколений, сколько их требуется для того, чтобы произошло скрещивание двух гетерозигот с образованием мутантной гомозиготы. Может пройти много поколений до тех пор, пока рецессивная мутация окажется в гомозиготном состоянии, и за это время мутантный аллель может стать довольно распространенным в популяции в гетерозиготном состоянии. Если генотип популяции однороден или известен, можно реконструировать (задним числом) происхождение нового рецессивного мутанта. Если, однако, генотип популяции неизвестен, то невозможно определить, когда впервые возникла рецессивная мутация, и ее можно считать (обоснованно или нет) одним из обычно имеющихся в популяции генов.

Очевидно, что обнаружение как рецессивных, так и доминантных мутаций облегчается при использовании чистых линий. Как отмечалось в главе 1, в чистых линиях самоопыляющихся бобов иногда неожиданно появлялись фенотипические варианты, обусловленные не флуктуациями среды, а мутациями. Если из-за невозможности самооплодотворения нельзя получить полностью чистые линии, то обнаружение мутаций облегчается, когда известны предсуществующие генотипы.

Мы увидели, как можно доказать, что некий фенотип появился в результате мутаций, однако, мы не определили, какое произошло генетическое изменение. Это изменение может предположительно включать как весь геном, так и генетический материал отдельного генетического локуса. Изменения последнего типа нельзя обнаружить цитологически. Однако, хотя и нельзя провести адекватного цитологического исследования, генетические исследования показывают, что связанное с возникновением *Нехартера* изменение хромосомы субмикроскопично. Обратимся теперь к мутациям, для которых известно, что они связаны с большим видимым изменением хромосомного состава, обнаруженным либо генетическими, либо цитологическими методами, и отложим для дальнейшего рассмотрения мутации, включающие субмикроскопические изменения хромосом.

ГЕТЕРОПЛОИДИЯ

Обнаружено, что гигантский тип ослинника *Oenothera*, названный *gigas*, является мутантом. Другие *Oenothera*, как и большинство размножающихся половым путем видов, диплоидны, т. е. обладают двумя наборами хромосом (по одному геному от каждой из гамет). Цитологическое исследование показывает, что у типа *gigas* имеется три генома; следовательно, такие особи *триплоидны*. Изучение других групп диплоидных растений выявило родственные типы, которые, как было показано, имеют четыре генома (*тетраплоиды*); другие типы могут содержать шесть (*гексаплоиды*) или восемь (*октаплоиды*) наборов. Хромосомный состав, включающий необычное число нормальных наборов хромосом, называется *гетероплоидным*. Существование лишних целых геномов было названо *полиплоидией*; этот термин применим к множественности гаплоидного числа, если нормальным состоянием является моноплоидия. Заметим, что при изменении числа геномов сохраняются те же отношения хромосом (и генов) друг к другу, что и при нормальных условиях. Такие изменения называются *эуплоидными* (прямопропорциональными).

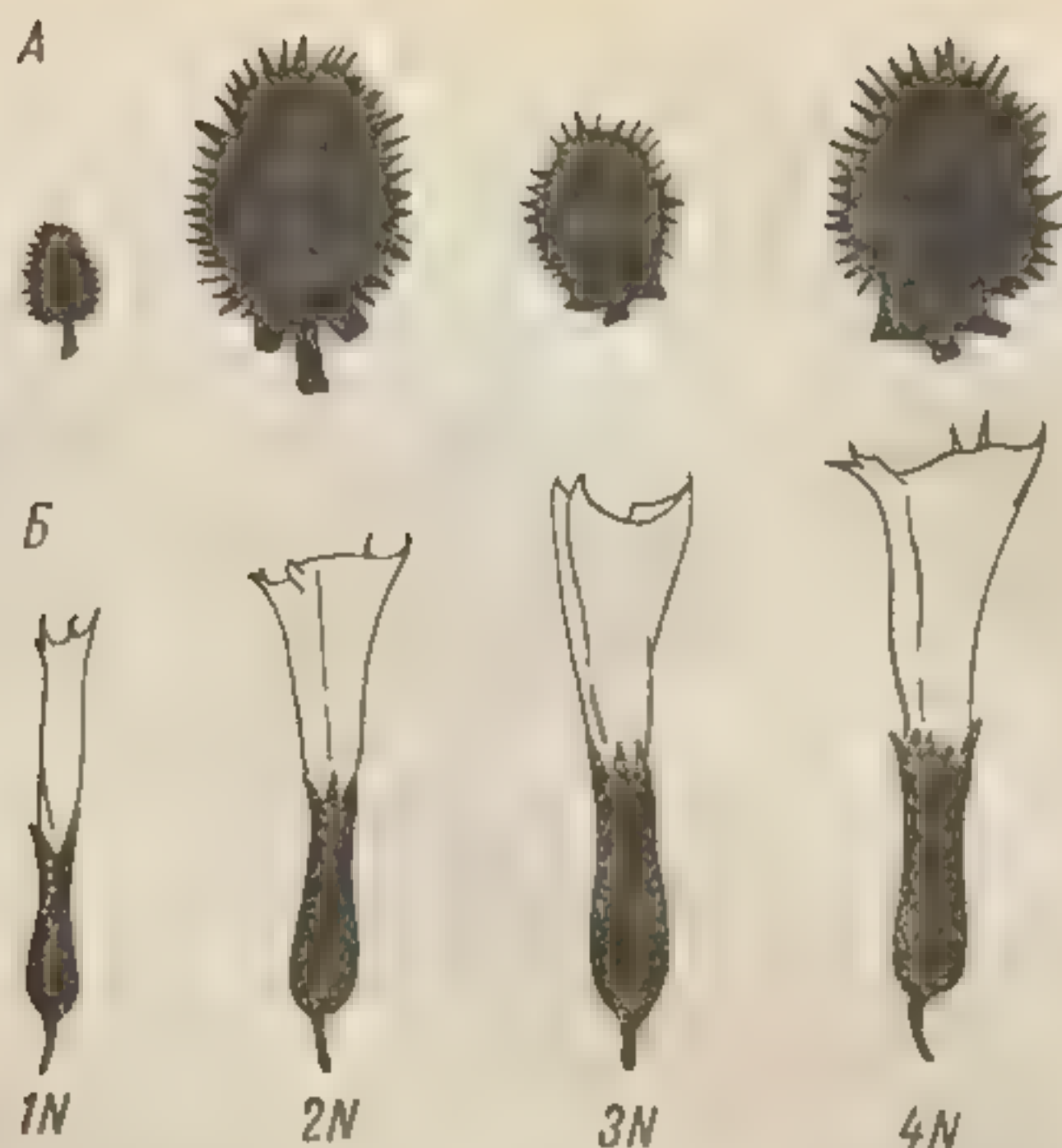
1. Аутополиплоидия

Различные формы дурмана *Datura* содержат разное число полных геномов и имеют разные *плоидности*¹. Некоторые из них гаплоидны, другие — диплоидны, триплоидны или тетраплоидны. На рис. 11—2, Б показаны

¹ Последующее изложение основывается на работе А. Ф. Блэксли и Дж. Биллинга.

цветки,
коробочк
растает
бочки, п
диплоид
в количе
У ря
эмбрион
например
круглого
полипло
плоидные
sophila:
и тетрап
найлены
Один
геномов
в случае
собами.
1. Мо
оказывает
обычно, д
бесполог
2. Ин
сливаются
гаплоидно
оплодотво
тию гапл
3. У г
этом полу
получатьс
другой га
Аутопо
и мейоз с
аналог ко
образом р
сорных во
Некото
продуциру

РИС. 11-2.
Плоидность дурмана
($N = 12$)



цветки, образуемые каждым из этих типов (соответствующие семенные коробочки приведены в верхнем ряду). Отметим, что размер цветка возрастает с увеличением плоидности. На рисунке показаны семенные коробочки, получающиеся при опылении исследуемого растения пыльцой диплоида — различия в величине обусловлены отчасти различиями в количестве содержащихся в них или развивающихся семян.

У ряда млекопитающих обнаружены триплоидные и тетраплоидные эмбрионы. Полиплоидны даже расы некоторых животных. Известны, например, тетраплоиды водяного рачка *Artemia*, морского ежа *Echinus*, круглого червя *Ascaris* и мотылька *Solenobia*. Были также найдены полиплоидные личинки саламандр и лягушек, хотя в этом случае полиплоидные расы не образуются. Полиплоидия обнаружена также и у *Drosophila*: были обнаружены триплоидные ($3X + 3$ набора A) (рис. 11-3) и тетраплоидные ($4X + 4$ набора A) самки. У *Drosophila* были также найдены отдельные гаплоидные ($1X + 1$ набор A) участки тела.

Один из возможных путей увеличения плоидности — это добавление геномов уже имеющегося типа — путем аутополиплоидии — как было в случае *Datura*. Аутополиплоидия может возникать различными способами.

1. Может быть ненормальной анафазой митоза, так что в одном ядре оказывается удвоенное число хромосом, и это ядро делится затем, как обычно, давая дочерние полиплоидные ядра и в конечном счете — путем бесполого размножения — полиплоидное потомство.

2. Иногда два образовавшихся в процессе мейоза гаплоидных ядра сливаются, образуя диплоидную гамету, которая, после оплодотворения гаплоидной гаметой, образует триплоидную зиготу. Соответственно оплодотворение оказавшейся без ядра гаметы может привести к развитию гаплоида.

3. У гаплоидных особей может произойти мейоз и, хотя обычно при этом получают гаметы, содержащие лишь часть генома, иногда может получаться и полная гаплоидная гамета, которая после оплодотворения другой гаплоидной гаметой образует диплоидную зиготу.

Аутополиплоидию можно вызвать искусственно, влияя на митоз и мейоз с помощью таких ядов, как колхицин или его синтетический аналог колцемид (которые разрушают веретено, предотвращая таким образом расхождение хромосом в анафазе), а также с помощью стрессовых воздействий (голодание) и низкой температуры или радиации.

Некоторые самки *Solenobia* образуют гаплоидные яйцеклетки, другие продуцируют диплоидные яйцеклетки. Развитие яйцеклеток обоих типов



РИС. 11-3.

Нормальная (слева) и триплоидная (справа) самки *D. melanogaster*

Тело самки 3N слегка больше, чем тело самки 2N; ее клетки также несколько крупнее (зарисовано Е. М. Уоллесом)

начинается без оплодотворения: они начинают развиваться *партеногенетически*. Однако во время развития ядра соответствующих индивидуумов сливаются попарно, что приводит к нормальным диплоидному или тетраплоидному состоянию. В этом случае нормальный партеногенез приводит к нормальной диплоидии или тетраплоидии. У многих других организмов вызванный искусственно партеногенез может привести к гаплоидному развитию.

Гаплоидное развитие обычно диплоидного организма, как правило, приводит к аномалиям. Последние могут быть иногда вызваны проявлением вредных генов, которые не проявляются в диплоиде из-за наличия в гомологичных хромосомах их нормальных аллелей. Однако это не всегда так. Если удвоение числа хромосом (как естественное, так и искусственно вызванное) происходит на ранней стадии развития, то может получиться нормальный диплоидный (и гомозиготный) зародыш; удвоение хромосом приводило, например, к образованию партеногенетических саламандр и кроликов (самок). По крайней мере в этих случаях причины ненормального развития гаплоида могут быть совсем другими. Одна из этих возможных причин заключается в соотношении объема и поверхности ядра и в соотношении между ядром и цитоплазмой. Эти соотношения изменяются, если приспособленная к диплоидному существованию клетка оказывается гаплоидной. Этим же можно объяснить и то, что развитие триплоидных и тетраплоидных зигот мыши через несколько дней прекращается, хотя первоначально частота митозов у них нормальна.

Изменения ploidy происходят также при гаметогенезе и оплодотворении. Эти и некоторые другие, уже обсуждавшиеся случаи изменения ploidy у разных организмов, происходят в норме. (Изменение ploidy может считаться мутацией, только если оно не происходило ранее.) Аутополиплоидия может встречаться в норме в какой-либо части

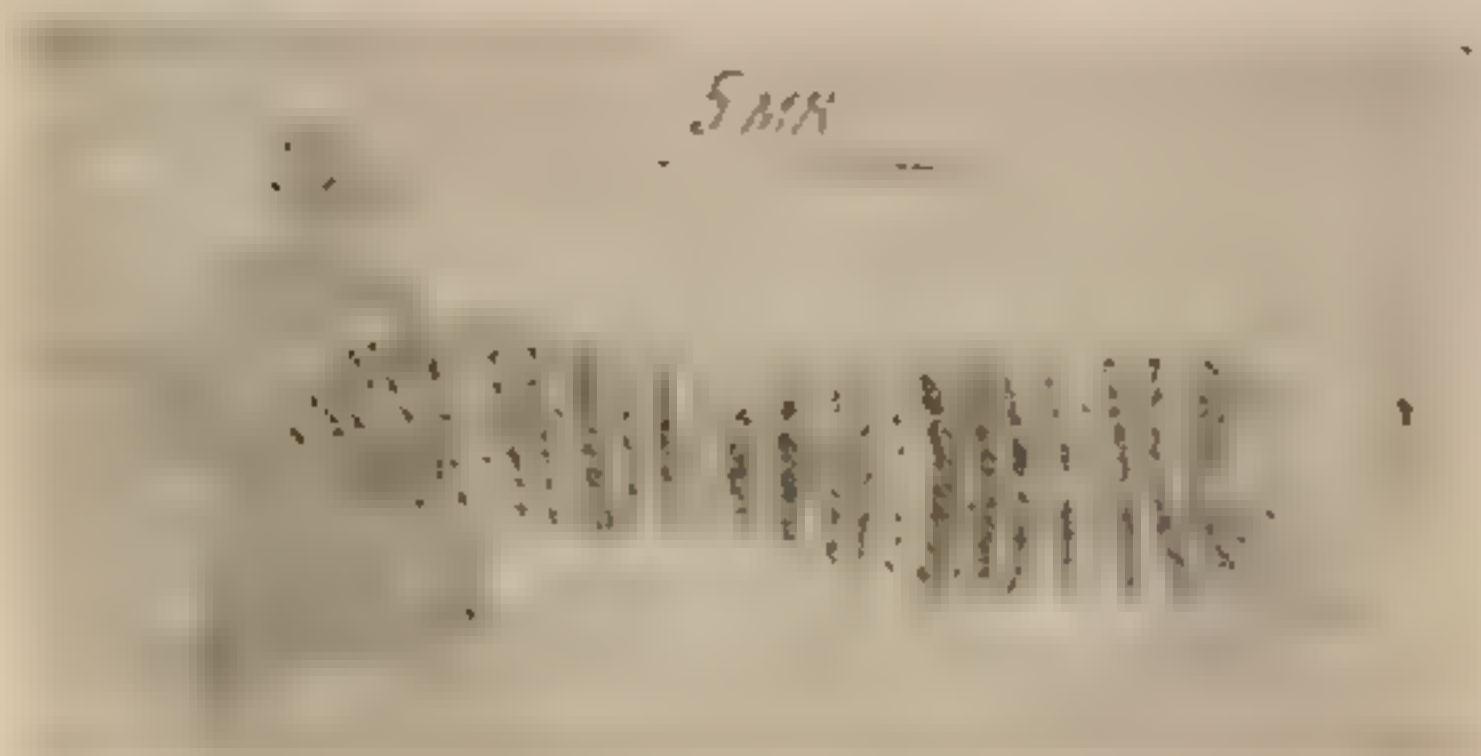


РИС. 11-6.

Пара хромосом IV, как она видна в ядрах клеток слюнной железы (каждый из гомологов обладает высокой полиинемностью) и в метафазе митоза (стрелка), нарисованная в одном и том же масштабе (C. B. Bridges. J. Heredity, 26, 62, 1935)



РИС. 11-4.

Хромосомы слюнной железы личинки самки *D. melanogaster*
(В. К а u f m a n n. J. Heredity, 30, 5, фронтиспис, май 1939)



РИС. 11-5.

Область диска (вверху) и между
дисками (внизу) натянутой хромо-
сомы слюнной железы дрозофилы.

Фотография получена с помощью элек-
тронного микроскопа при увеличении
около 12 200. (J. Heredity, 43, 231,
1952)

многоклеточного организма: например, она имеет место обычно в некоторых соматических тканях человека, таких, как печень. Во многих из упоминавшихся выше случаев аутополиплоидии увеличение плоидности происходит посредством *эндорепликации*: геном реплицируется и остается в ядре. В этих случаях дочерние нити хромосом разделяются, что приводит к увеличению числа отдельных хромосом, причем каждая из хромосом ядра проходит независимо через метафазу митоза. В результате эндорепликации может случиться и так, что все дочерние хромосомы остаются в синапсисе, так что число отдельных хромосом не увеличивается. Рассмотрим пример такого случая, который встречается в гигантских клетках слюнных желез личинки *Drosophila*.

2. Полинемия

Вспомним, что в обычной клетке *Drosophila* метафазная X-хромосома палочкообразна (см. рис. 7—4) и содержит хроматиды, каждая из которых туго скручена в ряд спиралей, подобных волоску в электрической лампочке; во время интерфазы хроматиды раскручены. Хроматиды хромосом клетки слюнной железы также находятся в раскрученном состоянии, возможно даже раскручены еще сильнее, чем в обычной интерфазе, и претерпевают три особых изменения.

1. Каждая из имеющихся хромосом реплицируется синхронно несколько раз подряд, так что одна хромосома образует две, две дают четыре, четыре образуют восемь и т. д. Эндорепликация может происходить по крайней мере девять раз, так что каждая хромосома может образовать 512 дочерних.

2. Все дочерние нити вместо того, чтобы разойтись, остаются сцепленными, так что гомологичные локусы расположены друг напротив друга, образуя *многонитчатый* — *полинемный*, или *политенный* — *пучок*.

3. Исходные члены пары гомологичных хромосом сцеплены в гомологичных локусах — явление, названное *соматическим синапсом*. Таким образом, получается двойной канат, в котором может находиться до 1024 хромосом.

Под микроскопом (рис. 11—4—11—6) в этих двойных канатах видны поперечные полосы, обусловленные различиями в плотности по длине

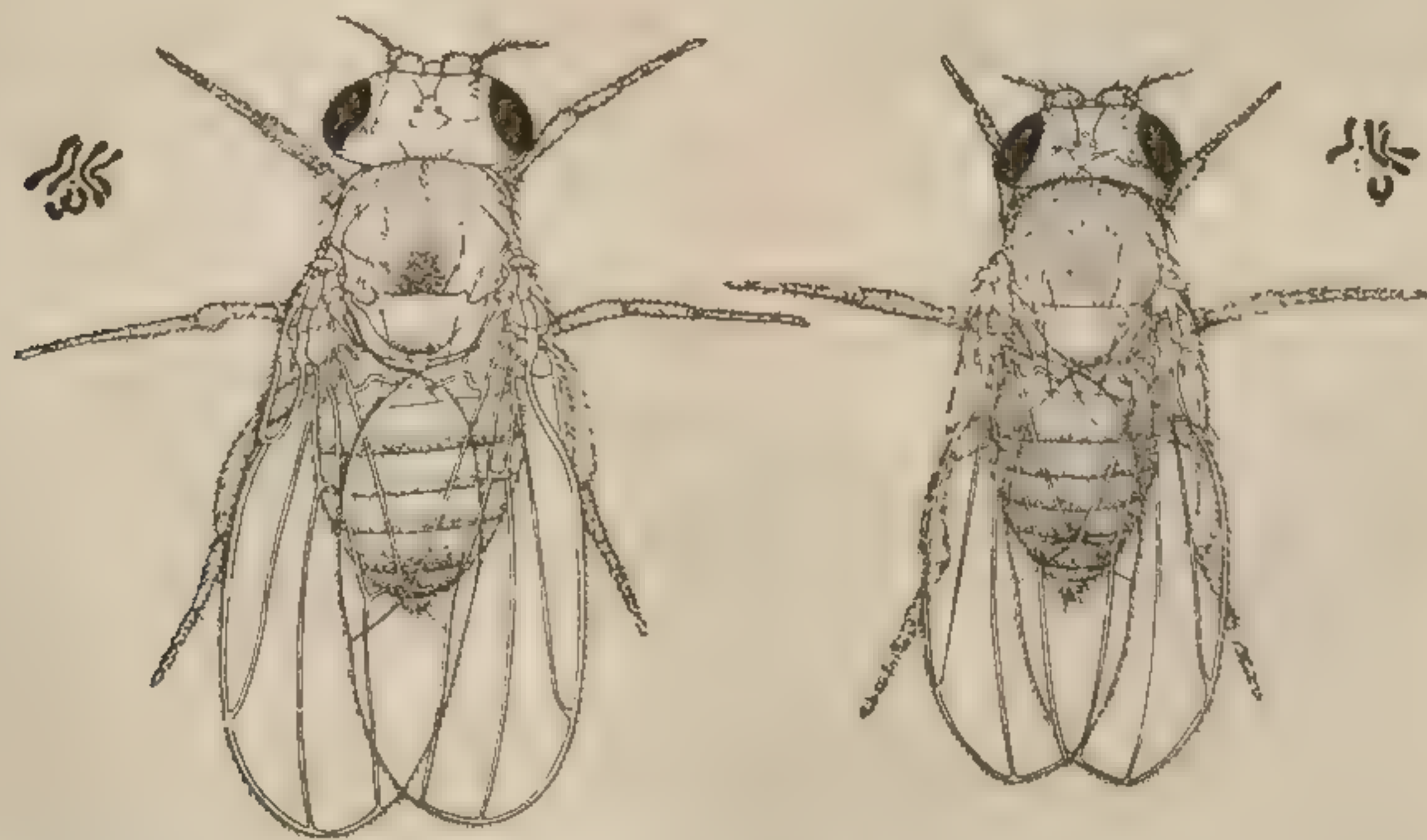


РИС. 11-7.
Гапло-IV (слева) и трипло-IV (справа) самки *D. melanogaster* (зарисовано Е. М. Уоллесом). Самка гапло-IV меньше, чем самка дикого типа, показанная на рис. 2—6

деспирализованных хромосом. Темная полоса (диск) получается в результате синапсиса одинаковых плотных участков всех нитей; в этом случае участок между дисками так же представляет собой результат синапсиса соответствующих участков с меньшей плотностью (рис. 11—5). Рисунок дисков настолько постоянен и характерен, что позволяет опознать не только каждую хромосому, но и разные участки внутри хромосомы (рис. 11—6). Огромная величина хромосом слюнных желез, очень длинных из-за деспирализованности и толстых из-за политенности, дает уникальную возможность установления соответствия данных генетики и цитологии. (Следует отметить, что, как правило, гигантские полинемные хромосомы получают в клетках, которые впоследствии уже никогда не делятся.)

На любой стадии клеточного цикла большая часть хромосомного материала окрашивается при определенных методах окраски одинаково, и эта часть была названа поэтому *эухроматиновой* (правильно или равномерно окрашенной). Остальные участки хромосом окрашиваются либо сильнее, либо слабее; они были поэтому названы *гетерохроматиновыми*. Обычно гетерохроматин расположен рядом с центромерой и в меньшей степени вблизи концов, хотя вообще он может находиться в различных местах плеча хромосомы. Для гетерохроматина характерна также меньшая специфичность при синапсе, чем эухроматина; в состоянии конъюгации часто оказываются разные гетерохроматиновые участки, находящиеся как в одной и той же хромосоме, так и в разных гомологичных или негомологичных хромосомах. В гигантских ядрах слюнных желез личинок *Drosophila* гетерохроматиновые участки, расположенные вблизи от центромер во всех хромосомах, находятся в синапсисе, образуя единую массу, названную *хромоцентром*. Это тот центр, из которого расходятся двойные пучки (на рис. 11—4 и слева на рис. 11—6). Иногда расположенные у концов гетерохроматиновые участки также оказываются в синапсе с другими участками гетерохроматина, особенно с хромоцентром. При раздавливании ядра (которое производят для того, чтобы разделить и расправить хромосомы слюнных желез) можно разорвать два находившихся в синапсе гетерохроматиновых участка; доказательством наличия синаптической связи служит то, что они остаются связанными нитями из какого-то, по-видимому, липкого материала, на рис. 11—6 на правом конце полинеи четвертой хромосомы видно такое клейкое вещество, что указывает на возможный синапсис с хромоцентром. Гетерохроматин окрашивается по методу Фельгена, и его нельзя отождествлять с участками между дисками, где нет, вероятно, вещества, красящегося по этому методу (D. Steffensen, 1963); эти участки, как и веретено, ахроматичны.

3. Аллополиплоидия

Увеличение пloidности может происходить и другим, отличным от аутополиплоидии, способом. Два вида могут вносить по одному или более геномов каждый для образования третьего вида, называемого *аллополиплоидным*. Культивируемая пшеница является аллополиплоидом. Как и следовало ожидать, аллополиплоиды часто обнаруживают смесь признаков родительских видов. Этот тип полиплоидии рассмотрен более подробно в главе 18.

Изменения числа геномов составляют класс мутаций, затрагивающих самую крупную единицу генетического материала. Хотя многие растения полиплоидны, а одно из растений имеет 512 хромосом, полиплоидия, если она происходит много раз подряд, приводит к слишком громоздкому для деления ядра числу хромосом. Нужно отметить также, что некоторые другие классы мутаций, например, затрагивающие отдельные локусы, должны проявляться в аутополиплоидах с большим трудом,

чем в гаплоидах или диплоидах, у которых или есть всего один другой гомологичный локус, способный маскировать действие мутации, или такой локус вовсе отсутствует.

АНЭУСОМИЯ

Следующая категория мутаций, которую нужно рассмотреть, включает добавление или утрату части хромосомного набора. Такие мутации нарушают нормальный баланс хромосом и генов и приводят к *анэуплоидным* («непропорциональным») хромосомным (генетическим) наборам, содержащим неправильное число отдельных хромосом (*анэусомия*). Посредством какого механизма может быть добавлена к геному или удалена из него отдельная целая (неразорванная) хромосома?

1. Дрозофила

Вы помните, что нерасхождение хромосом в половых клетках *Drosophila* может привести к потомству, содержащему XO, XXX или XXY, и диплоидному по остальным хромосомам. Нерасхождение малой четвертой хромосомы может привести к появлению мух с одной (особи гапло-IV) или тремя (особи трипло-IV) четвертыми хромосомами (рис. 11—7), которые в этом отношении являются, соответственно, моносомиками и трисомиками, тогда как обычные мухи являются дисомиками. Оба анэусомные изменения жизнеспособны, хотя, как можно видеть по фенотипам, добавление или утрата хромосомы IV вызывают видимые изменения фенотипа по сравнению с дисомией. Особи же, являющиеся моносомиками или трисомиками по любой из двух больших аутосом, погибают до вылупления из яйца.

Во время мейоза у триплоидных самок *Drosophila* — трисомных по всем хромосомам — в синапсисе могут образоваться пучки из трех гомологичных хромосом (*триваленты*). Это происходит в результате того, что в одном месте хромосомы конъюгация происходит между двумя гомологами, а в другом месте — между одним из этих двух и третьим гомологом. Таким образом, все три гомолога удерживаются вместе в виде тривалента, хотя везде конъюгация происходит между двумя гомологами. В первом делении мейоза расщепляются те два гомолога, которые конъюгировали в области центромеры, они расходятся к разным полюсам, тогда как третий гомолог отходит к любому из полюсов. В конце второго деления мейоза получаются два ядра, содержащие каждое по одному гомологу из тривалента, и два ядра, в каждом из которых имеется по два гомолога. То же получается и в случае, если два гомолога конъюгируют целиком, а третий в синапсе не участвует. Так как каждый из четырех имеющихся в метафазе I трисомиков расщепляется независимо, то получаются яйцеклетки, в которых содержатся:

1. по одной хромосоме каждого типа, т. е. имеется один полный геном (такие яйцеклетки гаплоидны);

2. по две хромосомы каждого типа, т. е. два генома (диплоидные яйцеклетки);

3. какая-либо комбинация, когда некоторые хромосомы имеются в единственном экземпляре, а другие — в двух (анэусомные яйцеклетки).

Мы видим, следовательно, что в результате мейоза получается много анэусомных гамет, в которых содержится нечетное число гомологов, как и в триплоидах, пентаплоидах и т. д. Так как в мейозе каждая хромосома должна иметь партнера, то в тетраплоидах четыре гомолога часто расщепляются на две пары. Иногда, однако, четыре хромосомы образуют тривалент и расщепляются на три и одну, так что и у полиплоидов с четным числом гомологов получается некоторое количество анэусомных гамет.

Поскольку фенотипический эффект любого гена зависит, прямо или косвенно, от фенотипического эффекта большинства, если не всех, других имеющихся генов, то следует думать, что диплоидный организм содержит в двух наборах хромосом баланс генов, соответствующий образованию преуспевающего фенотипа. Не удивительно поэтому, что при скрещивании гаплоидного организма с диплоидным получается очень мало потомства, так как после оплодотворения у большинства зигот нарушено хромосомное равновесие из-за отсутствия одной или более хромосом, необходимых для получения двух полных геномов. При скрещивании диплоидных особей с триплоидными также получаются зиготы, у которых баланс нарушен в другую сторону, так как у них имеется одна или несколько хромосом сверх двух геномов.

Однако в скрещиваниях с диплоидами триплоидный организм дает обычно больше потомства, чем гаплоидный. Это можно объяснить тем, что при добавлении хромосом к диплоидному состоянию баланс нарушается меньше, чем при удалении из него хромосом. Это легко понять, представив себе, насколько далеки каждое из этих двух ненормальных состояний от нормального (диплоидного). Когда имеется одна лишняя хромосома, то ненормальное число хромосом (три) в полтора раза больше нормального числа (два); когда же одна хромосома утрачена, то ненормальное хромосомное число (один) в два раза меньше нормального числа. Таким образом, добавление хромосомы приводит к менее значительному изменению баланса, чем утрата. Соответственно зная, что тройная доза большой аутосомы у *Drosophila* летальна, можно предсказать, что будет летальна и единичная доза. В этих случаях гибель наступает из-за нарушения баланса, вызванного избытком генов, находящихся в большой аутосоме в трисомных организмах, или же недостатком этих генов у моносомных особей.

2. *Datura*

Добавление или утрату хромосом можно рассмотреть также и на примере *Datura* (на основании работ А. Ф. Блексли и Дж. Беллинга). У этого растения гаплоидное хромосомное число равно двенадцати. Можно получить двенадцать разных типов растений, у каждого из которых сверх диплоидного числа имеется еще какая-нибудь одна из двенадцати хромосом. Каждому из этих трисомиков даны разные названия, такие, например, как «Globe». Можно также получить жизнеспособные диплоидные растения, у которых утрачена одна хромосома из какой-либо пары; они являются моносомиками, или *гаплосомиками*. Были найдены также растения с двумя лишними хромосомами одного и того же типа (тетрасомики) или с двумя избыточными хромосомами разных типов (двойные три-



РИС. 11-8.

Влияние наличия одной или нескольких избыточных хромосом «Globe» на строение коробочки дурмана

сомики). Данные, полученные на *Datura*, позволяют проследить фенотипические последствия нарушения нормального баланса хромосом. Сравним, пользуясь рис. 11—8, семенные коробочки нормального диплоида ($2N$) с коробочками диплоидов ($2N + 1$), обладающих одной лишней хромосомой типа Globe, и с коробочками диплоидов с двумя такими лишними хромосомами ($2N + 2$). Два последних полисомика могут быть названы, соответственно, трисомным диплоидом и тетрасомным диплоидом. Тетрасомик хромосомно устойчивее трисомика (так как у него в мейозе у каждой хромосомы есть партнер), однако фенотип его слишком отклоняется от нормы, чтобы могла образоваться тетрасомная раса, так как несбалансированность хромосомного набора у него еще больше, чем у трисомика; это приводит к еще большему отклонению от нормального диплоидного фенотипа.

Тетраплоидный ($4N$) организм, напротив, фенотипически почти не отличается от диплоидного, ибо здесь хромосомный баланс не нарушен. Тетраплоид с одной лишней хромосомой Globe ($4N + 1$, т. е. пентасомный тетраплоид) отклоняется от тетраплоида в том же направлении, в каком $2N + 1$ отклоняется от $2N$, но здесь это отклонение не столь значительно. Гексасомные тетраплоиды ($4N + 2$) отличаются от $4N$ почти столь же сильно, как $2N + 1$ отличаются от $2N$. Поэтому ясно, что добавление отдельной хромосомы к тетраплоиду слабее влияет на фенотип, чем добавление ее к диплоиду, так как в первом случае сдвиг в балансе между хромосомами относительно меньше, чем во втором. Таким образом, полиплоиды могут лучше диплоидов переносить добавления или утраты целых хромосом.

Поскольку скрещивания между тетраплоидами *Datura* дают фертильные семена в количествах, достаточных для поддержания тетраплоидной расы, то возникает вопрос: нельзя ли получить тетраплоидную расу *Drosophila*? Как указывалось, гаметы тетраплоидной самки *Drosophila* чаще содержат полные геномы, чем гаметы триплоидов. Такая самка производит много диплоидных гамет; она не препятствует созданию тетраплоидной расы. Тетраплоидный самец, чтобы быть нормальным, должен содержать $2X + 2Y + 4$ набора А (глава 8). Но во время мейоза X (и Y)-хромосомы у такого самца обычно конъюгируют друг с другом, так что после мейоза каждый спермий содержит в дополнение к 2 наборам А 1X и 1Y. При оплодотворении яйцеклеток (от тетраплоидных самок), содержащих $2X + 2$ набора А, спермий такого типа дает зиготы с $3X + 1Y + 4$ набора А, которые развиваются как стерильные интерсексы. Поэтому получить самоподдерживающуюся тетраплоидную расу *Drosophila* не удастся. Отсюда можно сделать вывод, что любой вид, содержащий гетероморфную пару половых хромосом (таких, как X и Y), не может образовывать полиплоидных рас, так как при мейотических делениях нарушается правильное соотношение между половыми хромосомами и аутосомами. Вероятно, именно поэтому у животных полиплоидные расы и виды встречаются реже, чем среди растений, у которых разделение полов (как и у гермафродитных форм) не связано с наличием гетероморфных гомологов.

3. Человек

Синдром Дауна у человека является иногда результатом трисомной диплоидной хромосомной конституции. В этом случае трисомиком является хромосома 21, третья из мельчайших хромосом человека (самой малой хромосомой является Y, рис. 11—9, 11—10). Известны также трисомии по некоторым другим малым аутосомам, причем каждый из них характеризуется определенными врожденными аномалиями. Трисомия по большим аутосомам, по-видимому, приводит к гибели до рождения,

возможно из-за нарушения баланса слишком большого числа генов. Очень серьезные фенотипические дефекты, обнаруженные у людей с трисомией по самым малым аутосомам, дают основание считать — в соответствии с представлением, что нехватка хромосомы вреднее, чем ее добавление, — что моносомное состояние любой аутосомы приводит к гибели еще до рождения.

Частота синдрома Дауна, обусловленного трисомией, среди новорожденных, равна примерно 0,2%. Чаще всего синдром Дауна встречается у детей более пожилых матерей и вызван главным образом нерасхождением хромосом при овогенезе. Если и у других хромосом частота нерасхождения примерно та же, то при оплодотворении получается, возможно, минимум 4,4% ($22 \times 0,2\%$) трисомных по аутосомам зигот. Может быть, возникает также еще 4,4% зигот — аутосомных моносомиков. Последние возникают из-за того, что с той же вероятностью яйцеклеткой становится гаплоидное в результате мейоза ядро, дополнительное к дисомному ядру — нулосомик. В действительности должно быть больше нулосомных, чем дисомных гамет, так как хромосома, утраченная одним дочерним ядром, не обязательно включается в сестринское ядро. Высокая частота анеупсомии в норме подтверждается тем, что примерно у четверти абортированных плодов у человека обнаруживаются хромосомные нарушения. Более того, следует думать, что многие зачатия, при которых имеет



РИС. 11-9.

Хромосомный набор нормальной женщины.

Клетка находилась в метафазе митоза (следовательно, хромосомы, за исключением центромера, уже удвоены), когда ее раздавили и сфотографировали (Т. Нгу)

РИС.

Хромосомный набор

После

изобра

место а
стадия

Хот

у челов

личивае

нерасхо

наблюд

при ро

маркиро

мия по

также

тывает

ker, 196

Числ

проника

и некото

ний у D

чивается

связанно

нерасхо

Хотя

ного мей

так и в р

что это е



РИС. 11-10.

Хромосомный набор, обнаруженный у женщины с синдромом Дауна (М. А. Фергюсон-Смит и А. В. Джонстон. *Ann. Internat. Med.*, 1960, 53, 361).

После фотографирования раздавленного препарата, аналогичного приведенному на рис. 11-9, изображения хромосом были вырезаны и распределены по парам, которые здесь и показаны

место анеупсомия и особенно моносомия, прекращаются на таких ранних стадиях беременности, что они проходят незамеченными.

Хотя приводящее к анеупсомии нерасхождение может происходить у человека также и при образовании спермиев, это, по-видимому, не увеличивает значительно общую частоту анеупсомии. У человека почти все нерасхождения связаны со старением овоцитов. У мышей, однако, наблюдается обратное явление, хотя у самок мыши — как и женщины — при рождении все половые клетки находятся на стадии овоцита. Так, маркированные хромосомы показывают, что у мышей спонтанная анеупсомия почти всегда обусловлена отцом. Следует отметить, что у мышей также наблюдаются жизнеспособные анеупсомии, когда трисомия захватывает половые хромосомы и некоторые малые аутосомы (Griffen a. Bunker, 1964).

Число случаев нерасхождения может быть увеличено воздействием проникающей радиации. Углекислый газ, другие химические вещества и некоторые диплоидные генотипы могут повышать частоту нерасхождений у *Drosophila*. Тот факт, что с увеличением возраста у женщин увеличивается риск рождения детей с трисомией, говорит о том, что какое-то связанное с возрастом нарушение метаболизма повышает вероятность нерасхождения.

Хотя утрата хромосомы может произойти как в результате спонтанного мейотического или немейотического нерасхождения у диплоидов, так и в результате нормального мейоза у полиплоидов, нельзя утверждать, что это единственные возможные способы утраты целых хромосом.

МОЗАИЧНАЯ ГЕТЕРОПЛОИДИЯ И АНЭУСОМИЯ

Мутации, приводящие к гетероплоидии, не обязательно затрагивают половые клетки или целый организм, как это уже отмечалось для видов, размножающихся неполовым путем (стр. 165—166). У растений или животных, размножающихся половым путем, можно обнаружить мозаичность по плоидности не только в гонадах, но и в соматических тканях. Например, был описан мальчик, у которого одни ткани были диплоидными, а другие — триплоидными. В некоторых культурах ткани человека примерно у 3% клеток также наблюдаются изменения плоидности.

Анэусомия может возникнуть при любом как митотическом, так и мейотическом делении ядра. Так, нерасхождение в первом делении ядра обычной зиготы человека может дать моносомное ядро и ядро, трисомное по хромосоме 21. В этом случае предполагается, что клетка, содержащая первое ядро, погибнет, а вторая даст организм с синдромом Дауна.

Некоторые анэусомии, рожденные женщинами старшего возраста, могли произойти при таком же постзиготном нерасхождении, которое наблюдали у мышей. Если нерасхождение происходит в ходе развития позже, то оно дает дополнительные пятна моносомных и трисомных мутантов на диплоидном фоне, которые, очевидно, в случае аутосом у человека и мыши — должны быть летальны для организма. Что такие нерасхождения или утраты хромосом действительно происходят с ощутимой частотой, подтверждается тем, что у взрослых людей часто встречается несколько клеток из сотни, в которых насчитывают на одну или две хромосомы меньше или больше нормы. Крайне маловероятно, чтобы все или даже большинство этих отклонений от нормы были вызваны ошибками экспериментаторов в приготовлении препаратов или при подсчете хромосом. Нужно думать, что в нормальных условиях анэусомные клетки, возникшие после рождения, должны в функциональном отношении быть хуже находящихся рядом эуплоидных клеток и, следовательно, должны быть в невыгодном положении при отборе.

Добавление или утрата целых хромосом, вызывая серьезное нарушение генетического равновесия, представляют собой класс мутаций, которые приводят к слишком резкому фенотипическому изменению, и потому не играют значительной роли в эволюции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутациями, затрагивающими самую большую рекомбинационную единицу генетического материала, являются эуплоидные изменения числа полных наборов хромосом — гетероплоидия. Плоидность может возрасти путем аллополиплоидии, аутополиплоидии или полинемии. Детально рассмотрены способы возникновения и поведение при скрещиваниях аутополиплоидов, а также возникновение и структура гигантских полинемных хромосом клеток слюнных желез у личинок *Drosophila*.

Утрата или приобретение части генома — анэуплоидия — может возникнуть из-за нерасхождения или расщепления хромосом у полиплоидов, особенно у тех, которые обладают нечетным числом геномов. Такие мутации происходят в половых и соматических клетках не только спонтанно; их частота может быть увеличена действием физических и химических факторов.

Добавление или утрата отдельных хромосом приводит к анэусомии. Отсутствие хромосомы вреднее для выживаемости, чем ее избыток. Анэусомия приводит к слишком резкому изменению фенотипа, чтобы иметь такое же значение в эволюции, как гетероплоидия.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

11.1. Откуда известно, что не всегда существовали генетические различия, имеющиеся в популяции в настоящее время?

11.2. Что Вы узнали из этой главы о характеристиках мутации?

11.3. Какая связь существует между мутациями и генами? Мутациями и рекомбинацией?

11.4. Как, на основании полученных теперь Вами знаний, следует изменить приведенное на стр. 19 утверждение о плоидности гамет?

11.5. Опишите хотя бы два возможных способа возникновения трисомии, приводящей к синдрому Дауна.

11.6. Единственный известный пока случай трисомии по хромосоме группы 19—20 встретился мозаично у 6-летнего мальчика. Чему это можно приписать?

11.7. Обсудите утверждение: «Все соматические клетки, возникшие из диплоидной зиготы, хромосомно идентичны».

11.8. Как Вы полагаете, извлечет ли человеческий род пользу из открытия, что некоторые люди являются трисомиками? Объясните.

11.9. Каковы преимущества аутополиплоидии? Аллополиплоидии?

11.10. Какое можно предложить генетическое объяснение тому, что, как это показано на рис. 11—2, семенная коробочка гаплоида *Datura* меньше, чем коробочка триплоида?

11.11. Как Вы думаете, каковы должны быть преимущества и вред полинемии?

11.12. Неоплодотворенные яйцеклетки млекопитающих могут содержать плоидности $1N$, $2N$, $3N$ или $4N$. Объясните, как каждая из них могла образоваться.

11.13. Как можно объяснить, что у людей с синдромом Дауна лейкемия бывает чаще, чем у нормальных диплоидов?

11.14. Объясните, почему у людей с синдромом Дауна наблюдается как большое разнообразие фенотипов, так и сходство в аномалиях.

11.15. У некоторых детей, сочтенных при рождении нормальными, к году начинают выявляться признаки синдрома Дауна. Что нужно сделать, чтобы гарантировать ранний диагноз синдрома Дауна?

11.16. Ожидаете ли Вы обнаружить корреляцию между рождением ребенка с синдромом Дауна и частотой выкидышей у его матери? С рождением последующих детей с синдромом Дауна? Объясните.

11.17. Если у женщины брат или сестра страдают синдромом Дауна, то должна ли она быть озабочена больше обычного риском рождения у нее такого же ребенка? Объясните.

11.18. Рассмотрев рис. 11—8 и 11—9, обсудите, насколько точно можно идентифицировать определенную хромосому человека.

11.19. С чего бы Вы начали определение хромосомного состава в соматических клетках какого-либо человека?

11.20. Обсудите, как влияет на фенотип добавление генома $N - 1$ у особей, которые в норме имеют N , $2N$, $3N$ или $4N$.

11.21. Описано две пары однойяйцевых близнецов, первая из которых состояла из мужчины XY и женщины XO, а вторая — из дисомного по хромосоме 21 мужчины и мужчины, трисомного по ней. Обсудите механизмы, которые могли вызвать появление таких близнецов. Учтите в Вашей гипотезе тот дополнительный факт, что у первого из упомянутых мужчин XY была обнаружена одна клетка типа XO.

ЛИТЕРАТУРА

- Ch. Auerbach. Mutation. An introduction to research on mutagenesis. Part I. Methods
Edinburgh, 1962.
- A. F. Blakeslee. New Jimson weeds from old chromosomes.— J. Heredity, 1934, 25, 80
- A. F. Blakeslee a. J. Belling. Chromosomal mutations in the Jimson weed. *Datura stramonium*.— J. Heredity, 1924, 15, 194.
- C. G. Bridges a. K. S. Brehme. The mutants of *Drosophila melanogaster*. Washington 1944.
- W. J. Burdette (Ed.). Methodology in mammalian genetics. San Francisco, 1963.
- Th. Dobzhansky. Genetics and the origin of species. 2nd ed. N. Y., 1941, Chap. 7, p. 223—253.
- A. B. Griffen, a. M. C. Bunker. Three cases of trisomy in the mouse.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1964, 52, 1194.
- E. Heitz a. H. Bauer. Beweise für die Chromosomennatur der Kernschleifen in den Knäuelkernen von *Bibio hortulanus* L. (Cytologische Untersuchungen an Dipteren, I).— Z. Zelloforsch; 1933, 17, 67.
- T. S. Painter. A New method for the study of chromosome rearrangements and plotting of chromosome maps.— Science, 1933, 78, 585. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 161.
- R. Patau, D. W. Smith, E. Therman, S. L. Inhorn a. H. P. Wagner. Multiple congenital anomaly caused by an extra Autosome.— Lancet, 1960, 1, 790.
- L. B. Russe. Chromosome aberrations in experimental mammals.— Progr. in med. Genet., 1962, 2, 230.
- D. M. Steffensen. Evidence for the apparent absence of DNA in the interbands of *Drosophila* salivary chromosomes.— Genetics, 1963, 48, 1289.
- E. Suomalainen. Significance of parthenogenesis in the evolution of insects.— Annual Rev. Entomol., 1962, 7, 349.
- M. J. S. White. Animal Cytology and Evolution, 2nd ed. Cambridge, 1954.

Рассм
цель
лежи
числе
разр
риро
проис
друг
соедин
рыбе,
сомы.
как та
делая
Об

друг
нению
имеют
близос
пронс
линейн
возник
жение
новите
теперь
структ

ПОСЛЕ
ХРОМО

Рассмо
разрыв
хромос
черным
хромос
сомной
однако
шли др
ми про
дочерн
в том
разорва
жащего
хромос
соедине
тельных

12 и. Гер

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМ

Рассмотренные в главе 11 два класса мутаций касались изменений числа целых хромосом или их наборов. В некоторых случаях в основе мутаций лежит добавление, утрата или перемещение части одной или большего числа хромосом. Всем таким структурным изменениям предшествует разрыв хромосомы, в результате чего получаются (если временно игнорировать существование хроматид) два новых «клеяких» конца. Если происходит несколько разрывов, то новые концы могут соединяться друг с другом строго попарно, причем, любой новый конец способен соединиться с любым другим. Кроме того, конец, получившийся при разрыве, не может соединиться с обычным (необорванным) концом хромосомы. Исходно свободные концы хромосом не являются «клеякими», так как там есть гены, названные *теломерами*, которые запечатывают концы, делая их неспособными соединяться с любыми другими концами.

Обычно концы, образовавшиеся при одном разрыве, соединяются друг с другом, приводя к *воссоединению* или *восстановительному соединению*. Последнее имеет место даже если в том же ядре одновременно имеются и концы, образовавшиеся при других разрывах. Следовательно, близость «клеяких» концов благоприятствует их соединению. Обычно происходит *воссоединение*, приводящее к восстановлению исходного линейного порядка хромосомы; но иногда могут соединяться концы, возникшие при разных разрывах. В результате получается новое расположение генов в хромосоме. Такое соединение поэтому является *не восстановительным*, а *обменным* или *перекрестным соединением*. Посмотрим теперь, как *не восстановительные* соединения приводят к различным структурным изменениям хромосом.

ПОСЛЕДСТВИЯ ОДИНОЧНОГО РАЗРЫВА ХРОМОСОМЫ

Рассмотрим сначала последствия *одиночного разрыва хромосомы*, т. е. разрыва обеих хроматид (рис. 12 1). На схеме 1 показана нормальная хромосома (ее хроматиды не нарисованы), центромер которой обозначен черным пятном. На схеме 2 эта хромосома разорвана. Если новые концы хромосомы соединяются друг с другом, т. е. *воссоединяются*, то хромосомной перестройки не происходит. Обычно имеет место *воссоединение*, однако иногда оно может не произойти из-за того, что новые концы отошли друг от друга, будучи разведены броуновским движением или токами протоплазмы. В этом случае при репликации хромосомы получается дочерняя хромосома, точно такая же, как родительская, — с разрывом в том же самом месте, как показано на схеме 3, где нарисованы две разорванные сестринские хромосомы. Соединение куска (*a*), не содержащего центромер, с несущим центромер куском (*b'*) другой сестринской хромосомы должно быть на самом деле *воссоединением*, так же как и *соединение a' с b*. (Иногда происходит только одно из таких *восстановительных соединений*.)

Но если восстановления не произошло ни до, ни после репликации хромосомы, то обычно соединяются концы, находящиеся наиболее близко друг к другу, т. е. соответствующие концы сестринских хромосом (a с a' и b с b'). Как показано на схеме 4, в результате таких невосстановительных соединений получаются одна хромосома без центромера (ацентрическая хромосома) и одна хромосома с двумя центромерами (дицентрическая хромосома). Заметим, что как ацентрическая, так и дицентрическая хромосомы состоят из двух одинаковых половинок, и поэтому их можно называть *изохромосомами*. (На нашей схеме хромосомы изображены в спирализованном состоянии перед метафазой.)

На схеме 5 можно видеть, что в анафазе митоза ацентрическая изохромосома не притягивается ни к одному из полюсов, тогда как дицентрик тянется одновременно к обоим полюсам. Поэтому ацентрическая изохромосома не включается ни в одно из дочерних ядер и таким образом утрачивается для обоих. (Ацентрические фрагменты, изображенные на схеме 3, будут элиминированы в каком-то из последующих делений, независимо от того, соединятся они друг с другом или нет.) Притягиваемая одновременно к обоим полюсам дицентрическая изохромосома образует *мост*. Существование мостика может привести к тому, что ни в одно из дочерних ядер не попадет ни одной части хромосомы, так что дицентрик элиминируется. И наоборот, участки дицентрика, несущие центромеры, могут войти в дочерние ядра, а мостик либо разорвется где-то между центромерами и дочерние ядра окажутся несвязанными или он может остаться, соединяя дочерние ядра друг с другом.

Степень нарушения фенотипа дочерних клеток и их потомства, вызванного отдельным невосстановленным разрывом хромосомы, зависит от того, какая хромосома затронута, от места разрыва и от судьбы дицентрика. Предположим, например, что разорвана хромосома IV у *Drosophila* (гапло-IV, особи которой часто жизнеспособны). Разрыв может произойти в любом месте хромосомы IV, причем утрата генов в ацентрическом фрагменте, хотя и вызывает нарушение, обычно не приводит к гибели; то же происходит и при утрате всего дицентрического фрагмента, если он элиминируется из обоих дочерних ядер, и, вероятно, при разрыве мостика между дочерними ядрами. (В последнем случае ни в одном из дочерних ядер не содержится по крайней мере генов, находившихся в ацентрическом фрагменте.)

Посмотрим теперь, что происходит, если мостик в виде дицентрической изохромосомы с линейным порядком $a. bcddcb.a$ (центромер находится между a и b) разрывается где-то не посередине между двумя d . Если мостик разрывается между a и c , то один фрагмент получается с еще большей нехваткой (но в нашем примере все еще жизнеспособный), тогда как другой содержит избыточную дозу генов, расположенных в области cd (и выживающий с большей вероятностью). Независимо от места разрыва мостика, в каждом из дочерних ядер есть центрический фрагмент, который после репликации образует, как правило, новую дицентрическую изохромосому и может снова образовать мостик при последующем митотическом делении. Поэтому в последующих делениях ядра могут быть *циклы: мостик — разрыв — расхождение — мостик*.

Если мостик не разрывается, оставляя связанными два дочерних ядра, то наличие такой связи может мешать последующим делениям. В нашем случае это препятствие, возможно, даже существеннее, чем присутствие или отсутствие всех генов, расположенных на мостике.

Предположим теперь, что у *Drosophila* разорвана одна из больших аутосом. Повреждение или гибель одной или обеих дочерних клеток могут быть вызваны нехваткой генов, если происходит элиминация ацентрического или дицентрического фрагмента из одного или обоих дочер-

них я
хожд
из-за
из-за
изохр
равны
чем д
мости
Ед
так и
анэуп
ных ф
в яйц
разум
геном
в зигот
или да
мейоза
ческие
привод
после.

ХРОМА

Разры
мосом
вероят
бы лу
от дру
только
матид
одной,
Не
сущест
невосс
парата
сомный

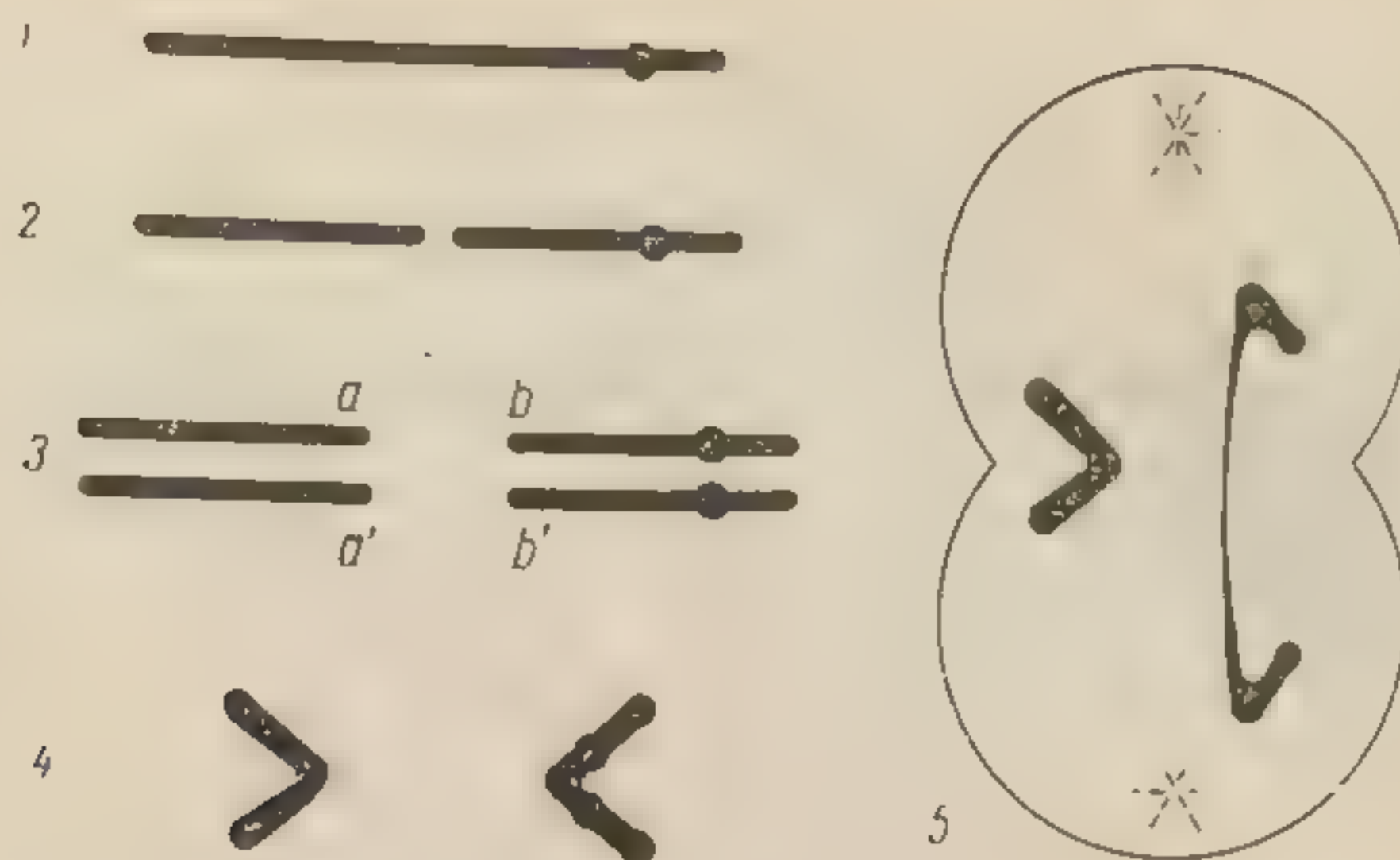


РИС. 12-1.

Последствия единичного невосстановленного разрыва хромосомы

них ядер. Кроме того, последовательные циклы мостик — разрыв — расхождение — мостик могут привести к гибели клеток будущих поколений из-за наличия в них аномальных количеств участков хромосомы, т. е. из-за анеуплоидии, возникшей в результате разрыва дицентрических изохромосом не точно посередине. Следует ожидать, что при всех прочих равных условиях более короткие дицентрики будут разрываться чаще, чем длинные. Естественно, что любой неразорвавшийся межъядерный мостик может помешать будущему делению ядра.

Единичные разрывы хромосом могут происходить как в соматических, так и в половых клетках. В последнем случае могут образовываться анеуплоидные гаметы. Так как обнаружено, что гены в гаметах животных физиологически неактивны, то анеуплоидные геномы могут входить в яйцеклетки или спермий, не нарушая их функционирования (как подразумевалось на стр. 111). Соответственно, у животных анеуплоидные геномы могут вноситься функционально неповрежденными гаметами в зиготу, что затем может привести к доминантным нарушениям развития или даже к летальным эффектам. У многих растений, однако, продукты мейоза образуют гаметофитное поколение, которое выполняет физиологические функции, требующие работы генов, и поэтому анеуплоидия чаще приводит к гибели или нарушениям развития до оплодотворения, чем после.

ХРОМАТИДНЫЕ РАЗРЫВЫ

Разрыв может произойти только в одной, а не в обеих хроматидах хромосомы. Такие *хроматидные разрывы* восстанавливаются с большей вероятностью, чем хромосомные, так как неразорванная нить служит как бы лубком, удерживающим новообразованные концы недалеко друг от друга. Однако то, что видно в микроскоп как разрыв, затронувший только одну хроматиду, могло быть исходно *хромосомным* (или *изохроматидным*) разрывом, за которым последовало воссоединение только одной, но (пока еще) не другой хроматиды.

Невоссоединившиеся хроматидные фрагменты, если они продолжают существовать достаточно долго и проходят репликацию, становятся невоссоединившимися фрагментами хромосомы. На цитологических препаратах можно видеть, что не соединившийся хроматидный или хромосомный разрыв, образовавшийся во время интерфазы, обычно продолжает

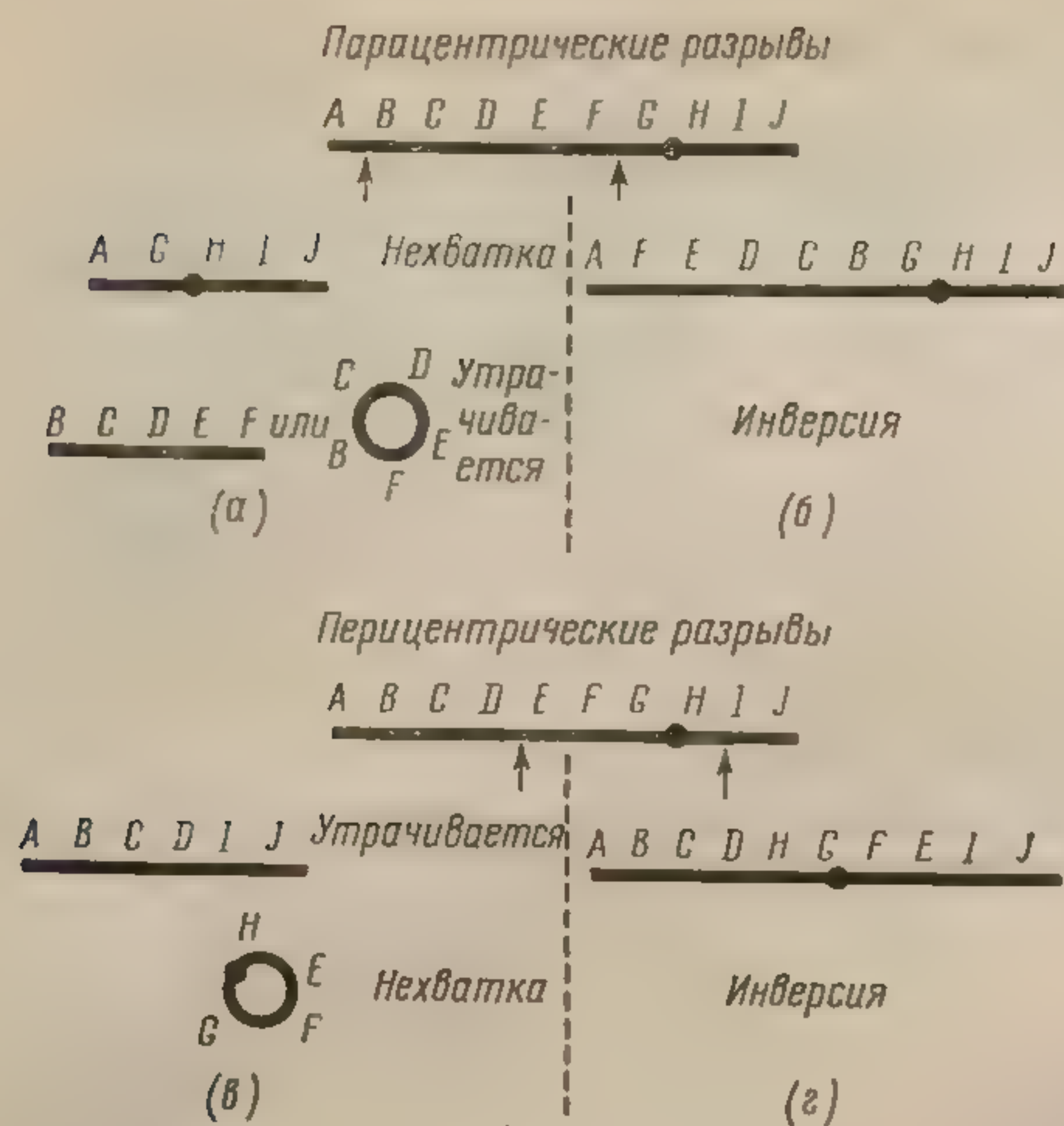


РИС. 12-2.

Некоторые последствия двух разрывов в одной хромосоме

существовать до тех пор, пока не произойдет деления ядра. Некоторые хроматидные и, возможно, хромосомные разрывы, образованные в сильно спирализованных (метафазных) хромосомах, могут быть не видны из-за того, что фрагменты, не будучи связанными, удерживаются вместе негеным вспомогательным материалом хромосомы. Чтобы обнаружить такие разрывы, нужно ждать следующего деления. Если хромосома спирализована, как, например, во время деления ядра, то подавляющее большинство образовавшихся при разрывах концов не являются «липкими»; соединения происходят в большинстве случаев (если не всегда) в период между поздней телофазой и ранней профазой. Соответственно, чем позднее в этот период имел место разрыв, тем меньше вероятность того, что концы его соединятся; наибольшим временем для соединения и, очевидно, максимальной вероятностью перекрестного соединения обладают концы разрыва, образовавшегося между ранней профазой и поздней телофазой.

Последующее рассмотрение ограничено для простоты изохроматидными разрывами, которые не воссоединились. Читателю предоставляется самому определить последствия анеуплоидии, возникшей в результате единичного невозстановленного разрыва хроматиды. Заканчивая на этом обсуждение мутаций такого типа, мы не будем здесь касаться вопроса об относительной частоте или значении хромосомных разрывов по сравнению с хроматидными. Агенты, способные вызывать хромосомные разрывы, могут вызывать также и разрывы хроматид; более того, некоторые агенты могут вызывать преимущественно хроматидные разрывы.

ПОСЛЕДСТВИЯ ДВУХ РАЗРЫВОВ В ОДНОЙ ХРОМОСОМЕ

Когда хромосома разорвана дважды, то разрывы могут быть *парацентрическими*, если они находятся с одной стороны от центромера, или *перицентрическими*, если центромер расположен между ними (рис. 12—2).

1. Нехватка

Рассмотрим хромосому с линейным порядком $ABCDEFGH.IJ$, с центром между G и H . При парацентрических разрывах (например, между A и B и между F и G) фрагменты могут соединиться, образовав центрическую хромосому ($AG.HIJ$, рис. 12—2, а) с нехваткой интерстициального (не концевой) ацентрического участка ($BCDEF$). Концы последнего могут в свою очередь соединиться, образовав кольцевую хромосому. В любом случае ацентрический фрагмент обычно элиминируется при последующем делении ядра. Если разрывы перичентрические (например, между D и E и между H и I), то концевые ацентрические фрагменты элиминируются, даже если они и соединяются друг с другом (рис. 12—2, в). Средний центрический участок может сохраниться, если его концы соединяются, образуя кольцо, и если нехватки не слишком велики. Даже если кольцо сохраняется, являясь не слишком *гипоплоидным* (анэуплоидное состояние с утраченными генами или участками хромосомы), оно все равно находится в невыгодном положении, ибо единичный перекрест с *некольцевым* (палочковидным) гомологом или с другим кольцом приводит (как можно увидеть, нарисовав отвечающие этим случаям конфигурации) соответственно к дицентрическому кольцу или палочке.

Конечно, неделящееся ядро, в котором произошел разрыв или другое структурное изменение, все еще является эуплоидным. Гипоплоидия или *гиперплоидия* (анэуплоидия из-за избытка генов или участков хромосомы) возникает впервые в образованных таким ядром дочерних ядрах. Об этой задержке появления анэуплоидного ядра следует помнить, когда мы говорим, что хромосомы с малыми *нехватками* могут быть летальны в гомозиготном состоянии и могут приводить к нарушениям в гетерозиготном состоянии; хромосомы с большими нехватками действуют обычно как доминантные летали в следующем поколении клеток. Нужно также помнить, что мы игнорировали — и будем продолжать игнорировать в этой главе — обычное последствие двух разрывов, т. е. воссоединение всех концов, получившихся при разрыве.

2. Инверсия

На рис. 12—2, в и г показано другое нарушение структуры в результате двух разрывов одной хромосомы. В этом случае средний участок хромосомы перевернулся относительно концевых участков, а затем соединился с ними. Получившаяся в результате *парацентрическая*, или *перичентрическая инверсия* (рис. 12—2, б и г) может возникнуть как из-за перемещения срединного участка при относительно неподвижных концах, так и в противоположном случае. Заметим, что инверсия представляет собой эуплоидную перестройку.

Структурные перестройки хромосом могут происходить как в соматических, так и в половых клетках. Инверсия, происшедшая в половой клетке, может сохраниться в популяции достаточно долго, так что она появится у некоторых особей в гомозиготном состоянии. Процесс мейоза у таких *гомозиготных по инверсии* особей протекает нормально, независимо от того, участвует ли тетрада в кроссинговере, так как у всех нитей тетрады одна и та же инверсия. Однако другие особи в популяции могут содержать одну из гомологичных хромосом с инверсией, а другую — без инверсии, т. е. быть *гетерозиготными по инверсии*. Если инверсия очень мала, то эти гомологичные хромосомы при конъюгации могут выстроиться правильно везде за исключением инвертированного участка. Гомологичные хромосомы не могут на таком коротком участке изогнуться так, чтобы гомологичные локусы сблизилась; поэтому в области инверсии не могут произойти конъюгация и перекрест. Поскольку перекрест

может привести к появлению более приспособленных рекомбинантов, то такие гетерозиготы по инверсии находятся в невыгодном положении по сравнению с гомозиготами по инверсии или с гомозиготами без инверсий из-за невозможности рекомбинаций между генами в области инверсии. Тем не менее очень небольшие инверсии у многих видов выживают.

Рассмотрим теперь процесс мейоза у гетерозигот по более значительным парацентрическим инверсиям. В этом случае (рис. 12—3, А) синапс между гомологами происходит везде, за исключением участков вблизи точек разрыва. Для синапса нужен изгиб одного гомолога, но не обоих, в области инверсии. Получилось так, что на рисунке изогнутой показана хромосома с инверсией, но равновероятно и обратное. Если перекрест происходит где-либо вне области инверсии, то все четыре продукта мейоза будут, как и обычно, *эуцентрическими* (с одним центромером у каждого). Если, однако, единственный перекрест имеет место где-то внутри области инверсии — как показано на рисунке между *C* и *D* — то две некроссоверные нити тетрады будут *эуцентрическими* (одна с инверсией, а другая — без) и две кроссоверные нити — *анэуцентрическими* (без центромера, или более чем с одним центромером). Один из анэуцентриков будет ацентрическим (с дубликацией по *A* и с нехваткой области *G.H.I.*); другой будет дицентрическим (с нехваткой и дубликацией по этим областям, соответственно). Внутри инверсии, если она не очень велика, может произойти только один перекрест; если же она достаточно длинна, то может произойти и двойной перекрест. Если это будет двойной перекрест двухнитчатого типа, то обе кроссоверные нити будут *эуцентрическими*.

У животных гаметы функционируют независимо от плоидности содержащихся в них продуктов мейоза. Если гамета содержит анэуцентрик, образовавшийся в результате перекреста в гетерозиготе по парацентрической инверсии, то эта хромосома должна обычно дать доминантный летальный эффект после оплодотворения; следовательно, особи, гетерозиготные по значительным парацентрическим инверсиям, находятся при самовоспроизведении в неблагоприятных условиях, что часто приводит к элиминации инверсии из популяции вскоре после ее возникновения в результате мутации. У видов, у которых в одном из полов нет кроссинговера, этот недостаток частично аннулируется. Например, у самцов *Drosophila*, любая из гомологичных хромосом, независимо от наличия в ней инверсии, некроссоверна, и все они с равной вероятностью могут войти в гамету. У некоторых видов, у самок которых происходит кроссинговер, во время мейоза действует некий особый фактор, если два митотических деления совершаются тандемно, как это имеет место у самок дрозофилы. В гетерозиготном по парацентрической инверсии ооците дрозофилы одиночный перекрест внутри области инверсии приводит к обычному дицентрику в анафазе I. Однако этот дицентрик удерживает диады в метафазе II, так что две *эуцентрические* монады расходятся к двум самым дальним из четырех полюсов. Поэтому в конце телофазы II *эуцентрические* продукты мейоза оказываются выстроенными в такой ряд: *эуцентрик*; часть *дицентрика*; остальная часть *дицентрика*; *эуцентрик*. Одно из двух крайних, содержащих *эуцентрики* ядра, становится ядром яйцеклетки, а остальные дегенерируют. Таким образом, *дицентрическая* нить не входит в ядро, становящееся ядром гаметы; поэтому гамета получает одну из двух *эуцентрических* некроссоверных нитей. Именно поэтому парацентрические инверсии любой величины редко приводят в любом из полов дрозофилы к *анэуплоидным* гаметам и поэтому могут сохраниться в природе.

Каков результат перекреста в области инверсии у гетерозиготы по большой периацентрической инверсии? Как видно на рис. 12—3, Б, единственный перекрест, например, между *F* и *G*, дает четыре *эуцентрические*

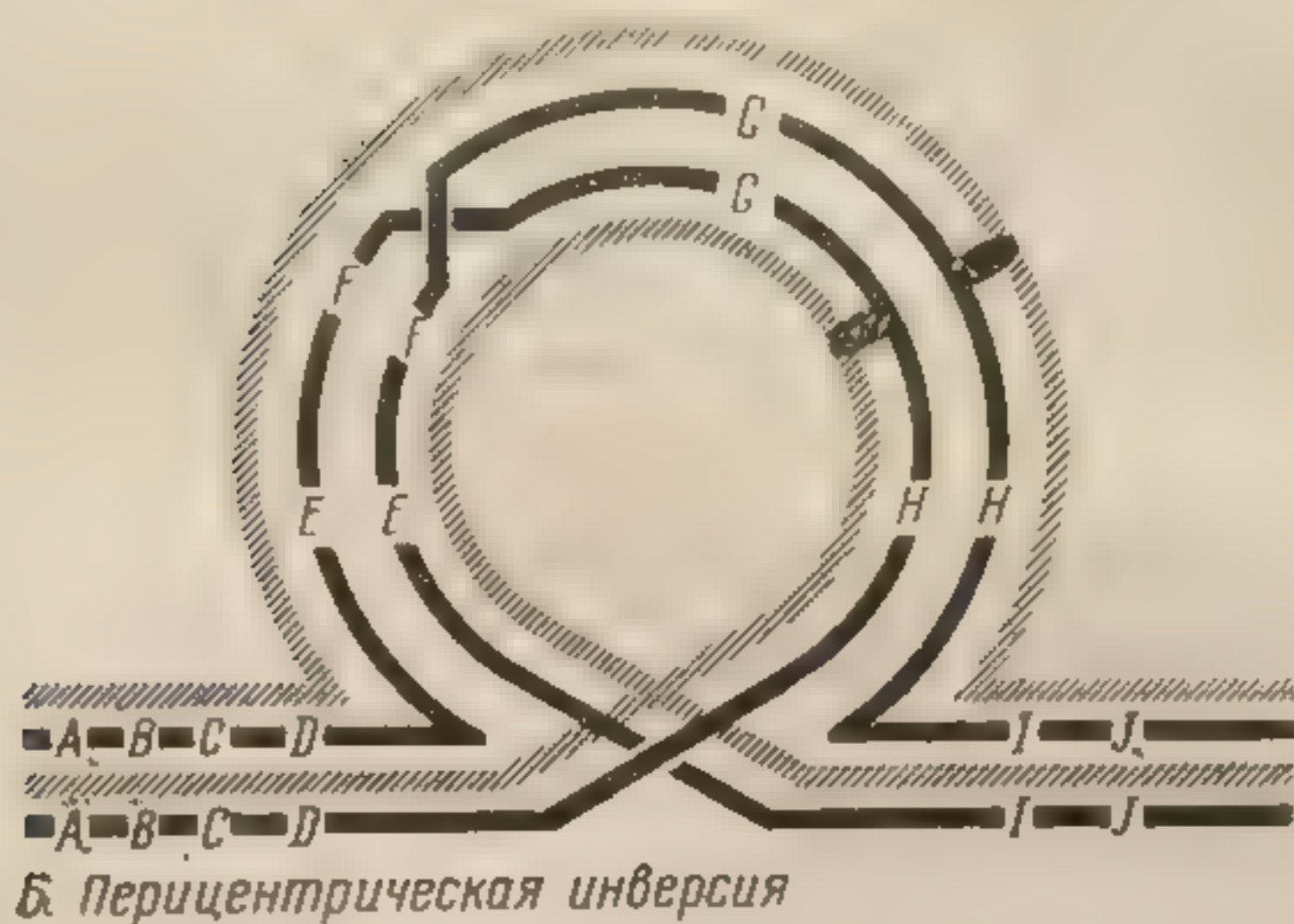
нити
с дуп
хват
говер
имею
кото
дроз
и по
ника
всегд
Поэто
пери
состо

3. Ду

Если
исход
то два
могут
интер
цией.
по от
фрагм



А. Парацентрическая инверсия



Б. Перичентрическая инверсия

РИС. 12-3.

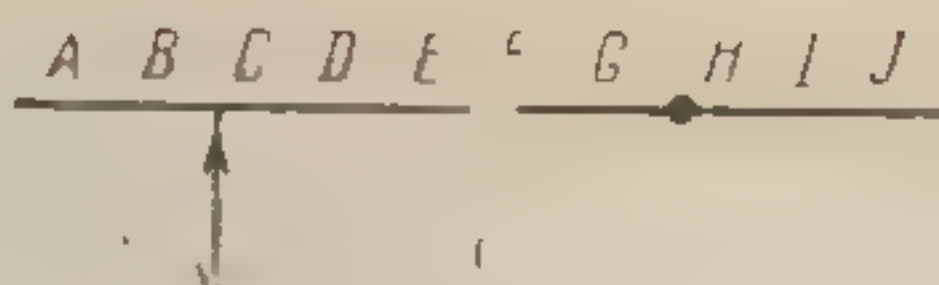
Единичный перекрест
в гетерозиготе по инвер-
сии (объяснение в тексте)

нити: две некроссоверные (одну с инверсией и другую без таковой); нить с дупликацией (по *ABCD*) и с нехваткой (по *IJ*); и, наконец, нить с нехваткой и дупликацией соответственно тех же участков. Если кроссинговер происходит у самца, то в мужские гаметы войдут все нити. Все нити имеют также равные вероятности быть представленными в гаметах самок, которые способны к кроссинговеру. Это справедливо даже в случае дрозофилы, у которой анеуплоидные нити не попадают в ядро яйцеклетки и потому все продукты мейоза эуцентричны. Итак, анеуплоидия, возникающая в результате перекреста внутри перичентрической инверсии, всегда ставит гетерозиготу в невыгодное положение при воспроизведении. Поэтому в природе обычно могут выживать только самые небольшие перичентрические инверсии — те, которые будучи в гетерозиготном состоянии, не могут образовывать синанса.

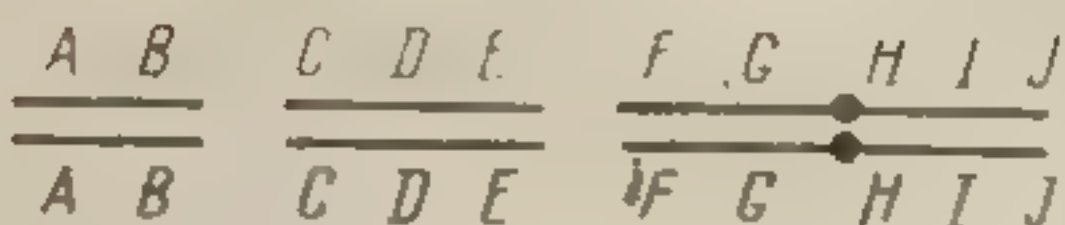
3. Дупликация

Если после двух разрывов одной и той же хромосомы соединения не происходит до тех пор пока разорванная хромосома не удвоится (рис. 12—4), то два интерстициальных участка и соответствующие концевые фрагменты могут соединяться, образуя эutelomernую хромосому с повторенным интерстициальным участком. Такая перестройка называется дупликацией. Один или оба дублированных участка могут быть инвертированы по отношению к их исходному расположению. Два оставшихся концевых фрагмента могут не соединиться, а могут и соединиться друг с другом.

Разрыв



Репликация



Перекрестные соединения

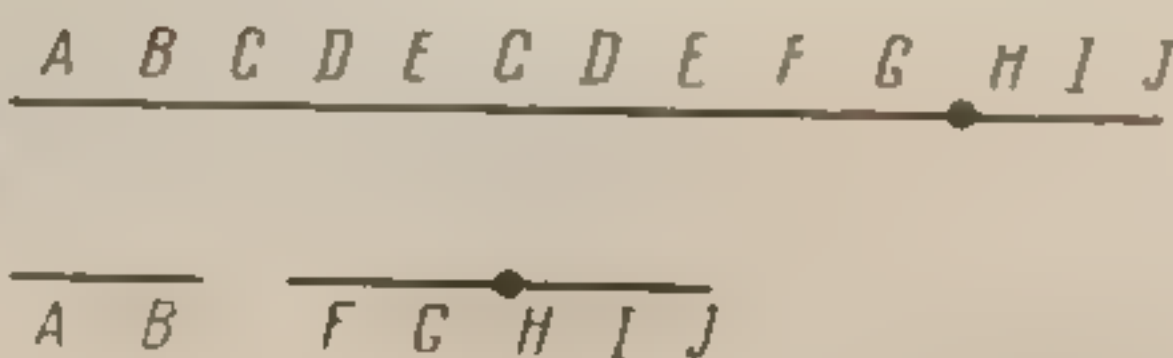


Рис. 12-4.

Дупликация (тандемного типа)

образовав хромосому с нехваткой. (Нехватка может быть также получена и без дупликации, если концевые фрагменты соединяются до репликации хромосомы.) Дупликация может сохраниться в природе, если дуплицированный участок достаточно мал и не содержит центромера.

ПОСЛЕДСТВИЯ ДВУХ РАЗРЫВОВ В ДВУХ ХРОМОСОМАХ

Что происходит, если возникают два разрыва — по одному в двух разных хромосомах? При этом может быть так, что две разорванные хромосомы негомологичны (рис. 12—5). Если в этом случае соединяются два центрических фрагмента, то образуется дицентрик, а два ацентрические фрагмента при последующем делении элиминируются, независимо от того, соединились они друг с другом или нет. Если все фрагменты соединяются так, как показано на рисунке, то получается взаимный обмен сегментами между негомологичными хромосомами, называемый сегментным обменом, или чаще *реципрокной транслокацией*. В данном случае происходит реципрокная транслокация *анэуцентрического типа*, которая при последующем делении часто действует как доминантная леталь, особенно если дицентрик притягивается одновременно к обоим полюсам.

Однако с равной частотой происходит и обратное; соединяются центрический фрагмент одной хромосомы и ацентрический фрагмент негомологичной, а также центрический фрагмент второй и ацентрический фрагмент первой хромосомы. Это — реципрокная транслокация *эуцентрического типа*. У организмов, гетерозиготных по такому обмену (рис. 12—6), у которых две негомологичные хромосомы имеют транслокации, а две их не имеют, образуются гаметы с нехватками и дупликациями (если при сегрегации в них входит только один, а не оба участника реципрокной транслокации).

В тех ядрах, в которых хромосомы сконцентрированы в относительно небольшом объеме, все концы разрывов расположены недалеко друг от друга; и обычно если происходит одно из двух необходимых для реципрокной транслокации соединений, то происходит и другое. Такая ситуация имеет место в ядре спермия дрозофилы непосредственно после оплодотворения. В яйцеклетках и, возможно, в других клетках с относительно большим объемом ядра расстояние между концами разрывов в негомологичных хромосомах так велико, что реципрокные транслока-

ции сравнительно редки и, даже если происходит одно перекрестное соединение, то два других конца разрывов обычно друг с другом не соединяются, так что получается только половина реципрокной транслокации — *полу-транслокация*. Как и следовало ожидать, утрата несоединенных фрагментов или иной исход подобного дефекта приводят обычно к гибели клеток потомства или к отклонению их от нормы. Полу-транслокации могут возникать также при сегрегации гетерозигот по эуцентрической реципрокной транслокации (см. рис. 12-6), когда в гамете имеется только одна из двух хромосом, участвующих в реципрокной транслокации.

Некоторые дети с синдромом Дауна имеют по 46 хромосом. Их хромосомный набор включает, кроме двух обычных 21 хромосом — гетероморфную пару аутосом (из группы 13—15 или из группы 16—18), одна из которых длиннее нормальной. Избыточный участок представляет собой, вероятно, длинное плечо хромосомы 21, так что такой организм гиперплоиден по этому участку хромосомы 21 — почти трисомия по этой хромосоме. В некоторых случаях фенотип матери не отличается от нормы, хотя она и гетерозиготна по эуцентрической реципрокной транслокации между хромосомами 21 и, например, 15. Ее хромосомную конституцию можно представить как 15, 15.21 (центромер от 15), 21.15 (центромер



Анеуцентрический тип



Эуцентрический тип

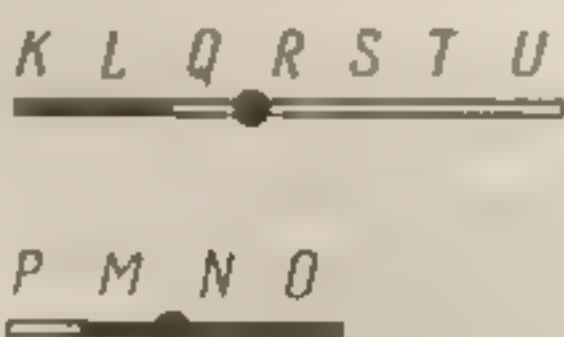


РИС. 12-5.
Реципрокная транслокация между нехомологичными хромосомами

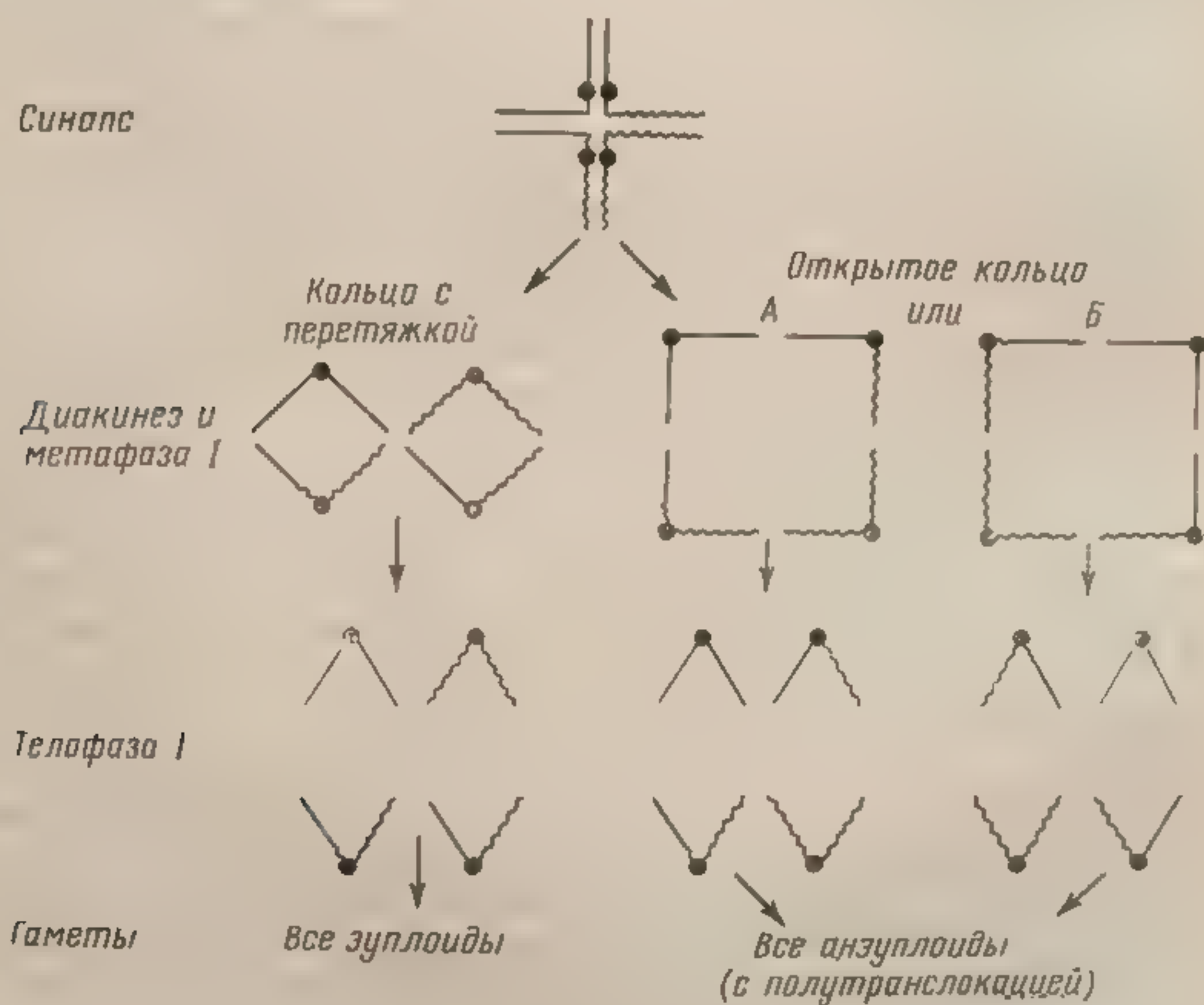


РИС. 12-6.
Схема расщепления в гетерозиготах по эуцентрической реципрокной транслокации. Не показаны хроматиды к веретену, ориентированному вертикально

от 21), 21. Яйцеклетка, содержащая 21 и 15.21 (полу-транслокация) и оплодотворенная нормальным спермием (содержащим 21 и 15), приведет к появлению почти трисомного по хромосоме 21 ребенка с синдромом Дауна. (Разрыв в хромосоме 15 может находиться так близко к концу, что гипоплоидный сегмент у больного с полу-транслокацией не будет летальным.) В других случаях такие больные с полу-транслокациями имеют фенотипически нормальных матерей с полу-транслокацией и 45 хромосомами. У таких матерей только одна нормальная хромосома 21, одна нормальная хромосома 15 и полу-транслокация 15.21. Гипоплоидность по хромосомам 21 и 15 столь незначительна, что не влияет на жизнеспособность матери; последняя может образовывать анеуплоидные гаметы, приводящие к рождению у нее больных детей. (Отметим, что в приведенных выше случаях нет связи между возрастом матери и появлением больных детей с полу-транслокацией.)

Возможен и второй случай, когда две разорванные хромосомы гомологичны (*ABCDEFGH.IJ*). Обычно разрывы происходят в разных местах, например, между *A* и *B* в одной хромосоме и между *D* и *E* в другой. И в этом случае реципрокная транслокация может произойти двумя способами. Транслокация анеуцентрического типа дает дицентрическую и ацентрическую хромосомы, судьбу которых легко предсказать. Эуцентрическая транслокация приводит к появлению двух эуцентрических хромосом, в одной из которых имеется нехватка участка *BCD*, а в другой — дубликация этого участка.

На основании сказанного выше, можно ожидать, что существует тенденция к элиминации из популяции эуцентрических реципрокных транслокаций вскоре после их возникновения, так как они обычно находятся в гетерозиготном состоянии и приводят к тому, что примерно 50% гамет оказывается полу-транслокационными анеуплоидами. Однако некоторые эуцентрические реципрокные транслокации очевидно относятся к исключениям из этого правила. В этих случаях происходит взаимный обмен почти целыми плечами каждой из хромосом. Такие реципрокные транслокации целого плеча — будучи в гетерозиготном состоянии у *Drosophila* и, возможно, у большинства других видов — имеют тенденцию конъюгировать и расходиться следующим образом: при конъюгации гетерозиготная реципрокная транслокация образует крестообразную конфигурацию, состоящую из двух тетрад (рис. 12-6). Затем, когда гомологичные центромеры отталкиваются друг от друга, разные центромеры движутся к одному и тому же полюсу, так что, когда хиазма подходит к концу, получается зигзагообразное расположение четырех диад (рис. 12-6). Из-за такой ориентации разных центромеров в анафазе I получается одно ядро без транслокации и другое с обеими транслокациями. Так как обычно образуются эуплоидные гаметы, то такие транслокационные гетерозиготы на плодовитость существенно не влияют.

УВЕЛИЧЕНИЕ ГЕННОГО ЧИСЛА

В этой главе и в главе 11 уже отмечалось, что изменение плоидности может сохраниться в природе, когда оно не нарушает хромосомный баланс (потому что касается целых геномов) или (если это эуцентрическая анеуплоидия) когда гипо- или гиперплоидны небольшие сегменты хромосом. В последнем случае количество недостающих или дублированных генов достаточно мало, и это приводит лишь к умеренному влиянию на фенотип. Очевидно, что чем больше количество хромосомного материала, тем больше сложность организма, и, следовательно, больше возможное разнообразие его фенотипов и выше приспособляемость. Поэтому жизнеспособные изменения плоидности должны быть особенно важны в эволюции органического мира. Отсюда желательно установить разные возможные

способы добавления к геному после разрыва хромосом небольшого количества генов.

Выше уже были описаны два способа увеличения числа генов после разрыва хромосом. Для одного из них нужно, чтобы в одной хромосоме произошли два разрыва; затем вся хромосома реплицируется, после чего концы разрывов соединяются, образуя хромосому с дублированным интерстициальным участком (стр. 185). В другом случае происходит по одному разрыву в разных местах каждой из пары гомологичных хромосом с последующим эуцентрическим перекрестным соединением (стр. 186).

Третий механизм включает три разрыва в одной хромосоме. Два интерстициальных фрагмента обмениваются местами, давая так называемый *сдвиг*. Если в гетерозиготе по сдвигу гомологи конъюгируют и в области сдвига происходит кроссинговер, то участок одного из кроссоверов будет дублирован, что можно увидеть, нарисовав получающиеся в результате нити.

Два разрыва в одной хромосоме и один разрыв в другой негомологичной хромосоме могут привести к тому, что интерстициальный участок первой хромосомы окажется включенным внутрь второй. Такой результат называется *транспозицией*. Содержащая транспозицию хромосома может в последующих поколениях оказаться вместе не с негомологичной хромосомой с нехваткой, фрагмент которой был перемещен, а с двумя нормальными хромосомами этого типа. Таким образом, получается организм, содержащий пару нормальных гомологов и часть нормального гомолога, находящуюся в гиперплоидном состоянии в негомологичной хромосоме.

Выше было показано, как разного типа разрывы могут привести к структурным изменениям одного и того же типа — дубликациям. Обнаружив перестройку, не всегда можно точно определить, какое число невозстановленных разрывов привело к ней, и поэтому предлагается всегда самое простое объяснение. Отметим также, что после разрыва может произойти утрата целой хромосомы; следовательно, не все такие утраты получаются в результате нерасхождения. Однако в противоположность нерасхождению разрывы не могут привести к появлению трисомиков.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Во время предыдущих рассуждений мог возникнуть вопрос о том, как обнаруживаются структурные изменения в хромосомах. Такие мутации могут быть обнаружены при цитологическом анализе, или же, если проводится генетическое исследование, на них могут обратить внимание сначала из-за того, что перестройки влияют на фенотип. Таким образом, обнаружить и определить тип структурных изменений можно или цитологически, или генетически, или при сочетании обоих методов.

Нехватки в гетерозиготном состоянии могут быть иногда распознаны генетически, так как они допускают проявление всех генов, гемизиготных в нормальной хромосоме. Можно подозревать наличие инверсий и транслокаций, если у гетерозигот по мутации оказывается заметно уменьшенное количество кроссоверного потомства. Если используются соответствующие генетические маркеры, то у гомозигот по инверсии некоторые гены оказываются расположенными в порядке, обратном нормальному, а у гетерозигот или гомозигот по транслокациям обычно несцепленные гены оказываются сцепленными. Иногда цитологическому исследованию предшествуют генетические исследования, показывающие, каков тип произошедшего структурного изменения и какая затронута

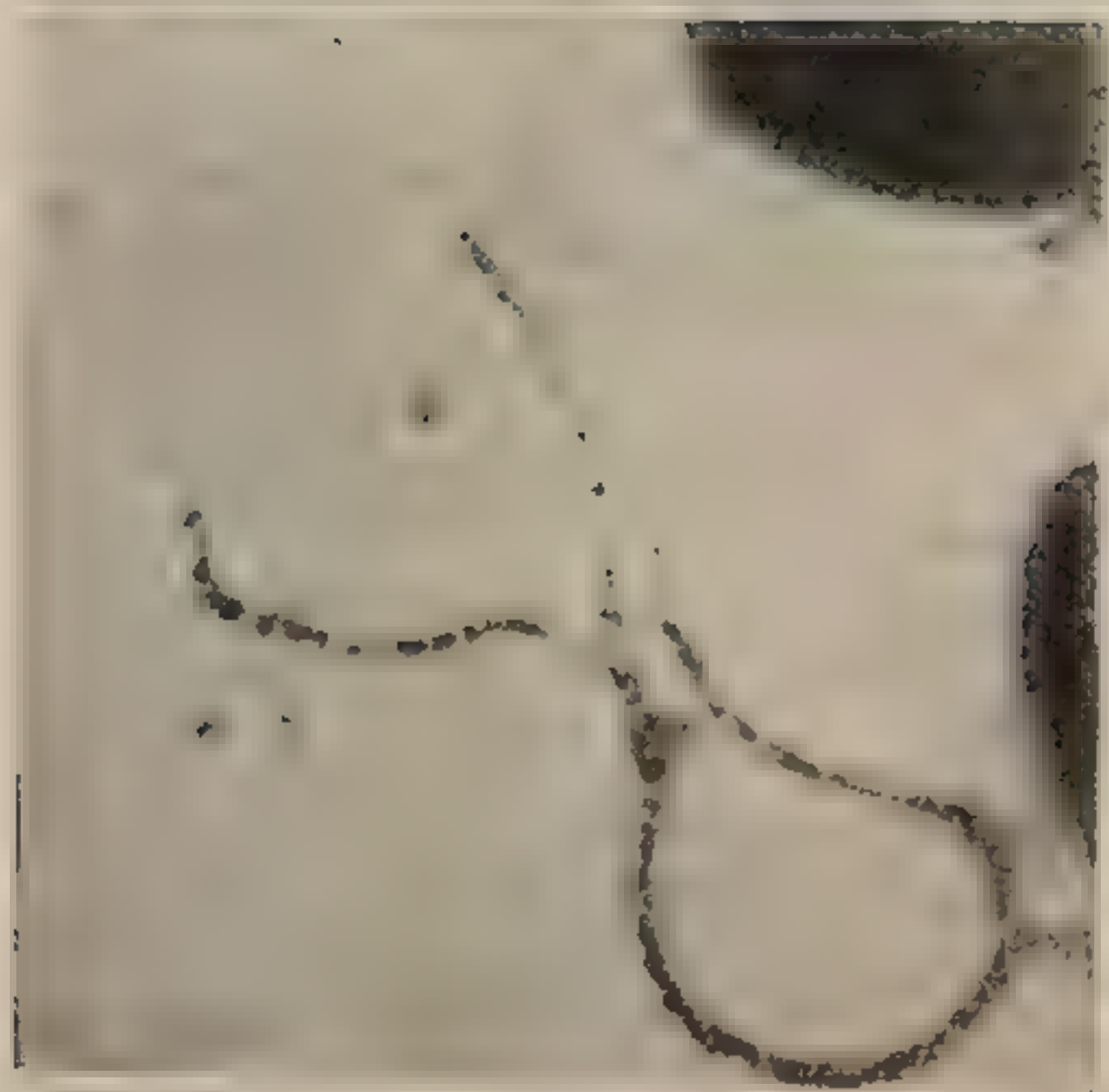


РИС. 12-7.

Гетерозиготы по инверсии в слюнной железе у дрозофилы (М. Демерек, вверху) и у кукурузы (пахинема) (препарат Д. Т. Морган-младшего)

хромосома (хромосомы). Конечно, такой работе должен предшествовать детальный цитологический анализ нормального генома.

Для цитологического анализа особенно удобна профазы мейоза некоторых организмов и гигантские хромосомы слюнных желез двукрылых, так как в обоих случаях конъюгация гомологичных хромосом позволяет определить наличие, отсутствие или перемещение определенных участков хромосом. Например, у гетерозигот по инверсии виден либо перевернутый сегмент, который не конъюгирует с гомологичным неперевернутым сегментом (если инверсия мала), либо видно, что один из гомологов изогнут для осуществления конъюгации (если инверсия больше) (рис. 12—7). Гетерозигота по нехватке образует петлю в области этой нехватки. Так как хромосома с дупликацией в гетерозиготе также может образовать петлю, то, чтобы отличить последний случай от нехватки, необходимо тщательное цитологическое исследование (рис. 12—8). У гетерозигот по реципрокным транслокациям (рис. 12—9) видны две пары нехомологичных хромосом, связанные друг с другом в синапсе.

Изложенного должно быть достаточно для ознакомления с природой, возникновением и последствиями наиболее часто встречающихся типов структурных изменений хромосом и с методами, используемыми для выявления таких мутаций.



РИС. 12-8.

Хромосомы слюнных желез, гетерозиготные по «сдвигу» в правом плече хромосомы III у *Drosophila melanogaster*. Участок из области «98» карты вставлен в область «91». Правый изгиб вызван отсутствием сдвинутого сегмента, а левый — его наличием (В. Kaufmann)

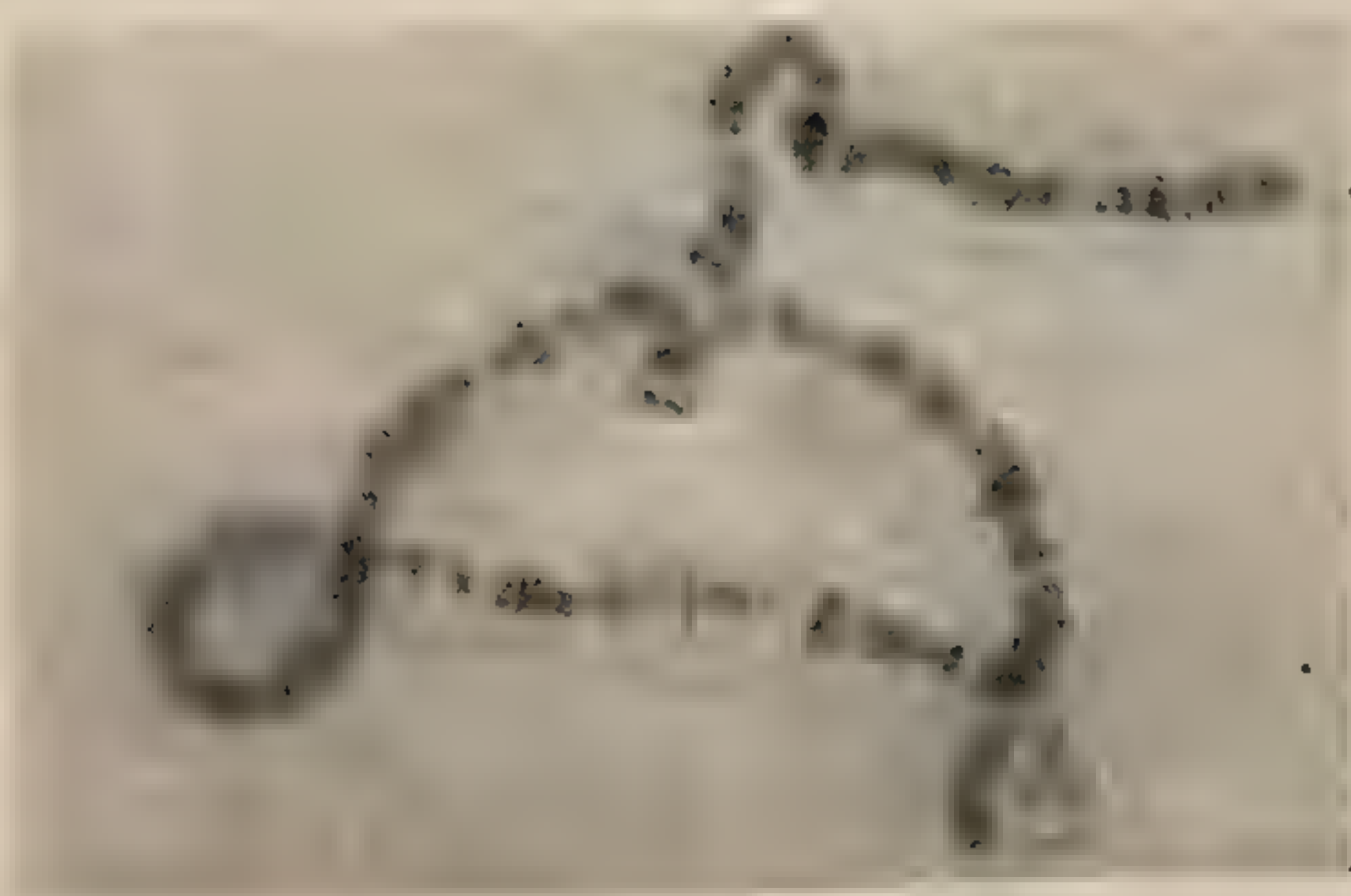
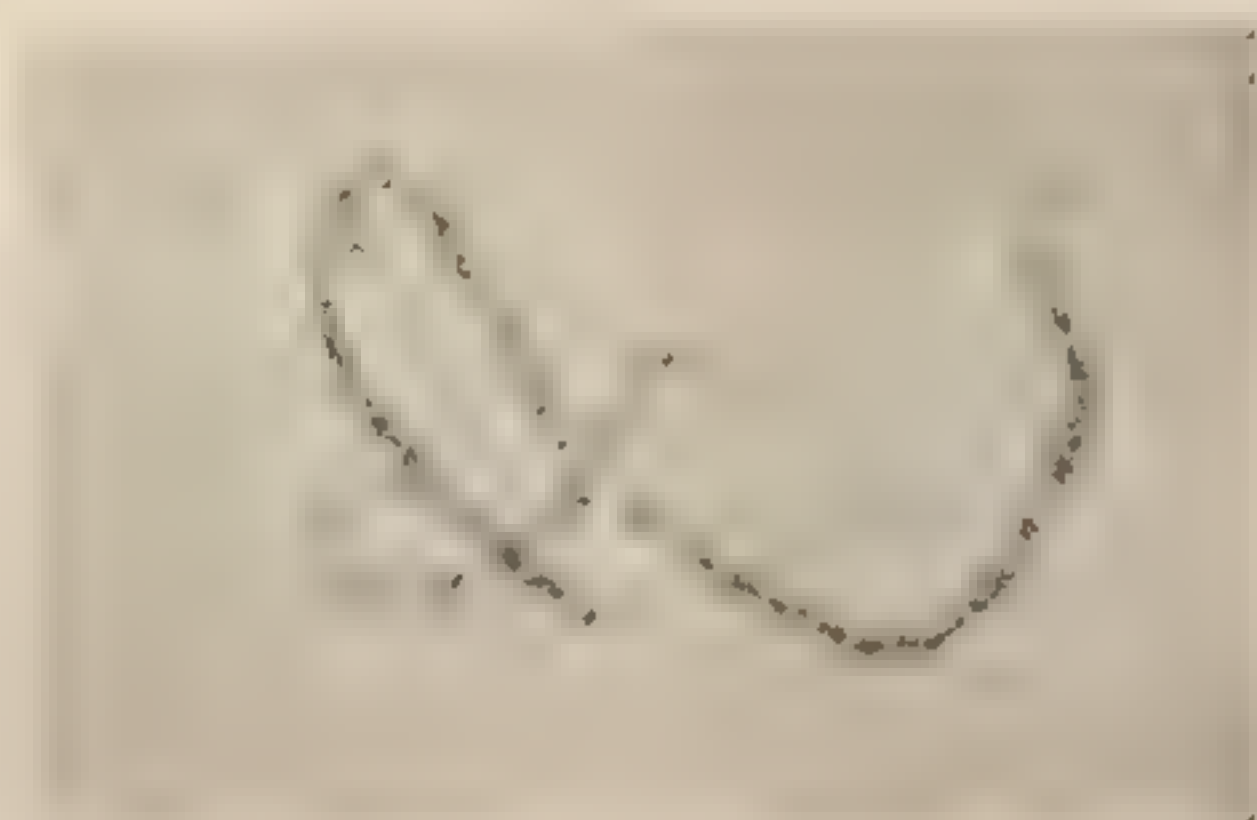


РИС. 12-9.

Гетерозиготы по реципрокной транслокации у кукурузы (пахинема) (фото М. Rhoads) и в слюнной железе у дрозофилы (фото В. Kaufmann)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные изменения хромосом представляют тип мутаций, включающих добавление, потерю или перемещение участков хромосомы. Для всех таких мутаций требуется разрыв хромосомы или хроматиды. Так как близость концов благоприятствует соединению, то большинство концов, образующихся при разрывах, воссоединяются. Соединения происходят в основном во время интерфазы. Неправильные соединения приводят к структурным изменениям в хромосомах. Обсуждаются случаи одного, двух или трех невосстановленных разрывов в связи с утратой целых хромосом, образованием нехваток, дупликаций, инверсий, транслокаций, сдвигов и транспозиций.

Клетки, в которых возникают такие мутации, являются эуплоидными, но они могут стать анеуплоидными после мейоза, сегрегации или кроссинговера. С наибольшей вероятностью в популяции сохраняются самые небольшие структурные изменения; скорее всего для эволюции существенны те изменения, которые прямо или косвенно приводят к увеличению числа генов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

12.1. Названия *эуплоидные* и *анэуплоидные* (гипо- или гиперплоидные) применяются по отношению и к отдельным хромосомам, и к целым ядрам. Привести пример:

- а) гипоплоидной хромосомы в эуплоидном ядре;
- б) гиперплоидной хромосомы в гиперплоидном ядре;
- в) анеуплоидного ядра, все хромосомы которого структурно не изменены.

12.2. Что означает использованный на стр. 183 термин *эутеломерный*? Назовите два типа анеутеломерных хромосом.

12.3. Нарисуйте как можно больше различных результатов разрывов хромосомы $AB \mid CDE \mid F.GHJ \mid J$, где точка обозначает центромер, а наклонные линии — места трех одновременно произошедших разрывов. Укажите, какой из результатов должен встречаться чаще всего.

12.4. У *Drosophila* утрата хромосомы, приводящая к моносомии, происходит в 3—5 раз чаще, чем добавление этой же хромосомы, приводящее к трисомии. Объяснить.

12.5. Как среди зигот человека появляются моносомиики?

12.6. Обсудите возможность обнаружения в хромосомах человека, находящихся в метафазе митоза:

- а) парацентрической инверсии;
- б) перичцентрической инверсии;
- в) нехватки;
- г) дупликации;
- д) полутранслокации.

12.7. Какую пользу может принести инверсия?

12.8. Какие особенности клеток, проходящих овогенез, благоприятствуют возникновению и передаче потомству полу-транслокаций?

12.9. Самец *Drosophila*, дигибридный по мутациям *bw* и *st*, при обратном скрещивании с *bw bw st st* дает обычно потомство с фенотипами в отношениях 1:1:1:1. В очень редких случаях при таком скрещивании получается потомство, имеющее только два фенотипа из наблюдающихся нормально четырех. Как объяснить такое исключение?

12.10. Является ли теломер геном? Почему?

12.11. Объясните, как можно цитологически определить положение локуса *white* в X-хромосоме *Drosophila* с помощью:

- а) делеций различной величины;
- б) инверсий различной величины;
- в) различных реципрокных транслокаций.

12.12. Предположим, что у Вас есть самоподдерживающаяся линия *Drosophila*, все самки которой имеют желтое тело, а все самцы — серое. Как объяснить это постоянство, если смертность яиц всегда была 50%? Как проверить Вашу гипотезу цитологически?

12.13. а) Несколько сцепленных с X-хромосомой мутаций у *Drosophila* дают вырезки на крыльях. Одна из таких мутаций летальна у самцов, а также у гомозиготных по мутации самок. Каким образом получают такие гомозиготы?

б) Гетерозиготная по такой мутации самка ($N/+$) скрещивается с самцом fa/Y . В F_1 все сыновья нормальны, половина дочерей также нормальна, а половина с вырезками на крыльях и «грубыми» глазами. Объясните этот результат и покажите, как можно проверить Вашу гипотезу.

12.14. Изобразите схематически различные эуцентрические реципрокные транслокации между аутосомами 2 и 3 у *Drosophila*, которые, по Вашему мнению, должны быть летальными в таких случаях:

- а) когда имеется любая полутранслокация;
- б) когда имеется одна полутранслокация, но не другая;
- в) никогда.

12.15. Облегчает ли отсутствие кроссинговера у самцов дрозофилы обнаружение гетерозиготных реципрокных транслокаций? Объясните.

12.16. Бывают мухи *Drosophila*, гетерозиготные по эуцентрической реципрокной транслокации между хромосомами 2 и 3. Каждая из этих полутранслокаций по отдельности летальна. Обсудите характер карт сцепления, которые получились бы из скрещиваний:

- а) генетически маркированных самок этого типа с соответствующим образом маркированными самцами без транслокаций;
- б) генетически маркированных самцов этого типа с соответствующим образом маркированными самками без транслокаций.

12.17. Хромосома $A.BCDEEDCFG$ имеет перевернутую дупликацию участка CDE . Сравните устойчивость этой хромосомы с устойчивостью хромосомы $A.BCDECDEFG$, в которой есть смежная дупликация того же самого участка.

12.18. У *Drosophila* каждый из генов загнутых вверх крыльев (Cy), сливового цвета глаз (Pm), отсутствия мелких щетинок (H) и наличия двух щетинок на груди (D) летален в гомозиготном состоянии. Самец без щетинок и с загнутыми крыльями при скрещивании с сливоглазой двущетинковой самкой дает 16 равновероятных типов сыновей и дочерей. Один из сливоглазых сыновей F_1 , двущетинковый с загнутыми крыльями и без мелких щетинок, подвергнут рентгеновскому облучению и затем скрещен с сливоглазой двущетинковой самкой. Из F_2 отобраны три сына, фенотипически похожие на отца и после скрещивания их по отдельности с самками дикого типа в потомстве F_3 были получены следующие самцы и самки:

| Фенотип | Сын 1 | Сын 2 | Сын 3 |
|---------|-------|-------|-------|
| CyH | 140 | 120 | 76 |
| CyD | 120 | — | 81 |
| PmH | 135 | — | 84 |
| PmD | 154 | 117 | 79 |

Объясните эти результаты, используя цитогенетические схемы для всех упомянутых особей.

12.19. а) Обсудите частоту выкидышей у нормальных матерей, рождающих детей с полутранслокацией и синдромом Дауна.

б) Думаете ли Вы, что иногда рождение ребенка с синдромом Дауна может зависеть от отца, но не от его возраста? Объясните.

12.20. У разных фенотипически нормальных мужчин Y-хромосомы разной величины. С другой стороны, женщины с небольшой X-хромосомой фенотипически ненормальны. Как можно объяснить происхождение таких различных X- и Y-хромосом и разницу в их действии на два пола?

ЛИТЕРАТУРА

A. G. Bear и J. L. German. III. Chromosomes and Disease.— *Scient. Amer.*, 1961, 205, 66.

H. J. Muller. The nature of the genetic effects produced by radiation. In: «Radiation Biology». A. Hollaender (Ed.). N. Y., 1954, Chap. 7, p. 351.

K. Patau. The origin of chromosomal abnormalities.— *Pathologie — Biologie*, 1963, 11, 1163.

L. B. Russel. Chromosome aberrations in experimental mammals.— *Progr. in Med. Genet.*, 1962, 2, 230.

В пр
сом
к их
мосом
мосом
таннь
разрь
могут
рассм
Ра
бующ
от ти
излуч
ляется
как у
дения
электр
излуч
приве
вает
с энер
новски
тоны
шей в
гии в
погло
водит
беремо
уже п
По
предст
меньш
или у
(или п
атомам
электр
частиц
скорос
от дру
мы, ес
мы, за
ионами
будет
образо
часто м
заций
ионных

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМ,
ВЫЗВАННЫЕ ОБЛУЧЕНИЕМ

В предыдущей главе обсуждались типы структурных изменений хромосом и их последствия, но мало было сказано о процессах, приводящих к их появлению, а именно, о разрыве и перекрестном соединении. Хромосомы разрываются спонтанно, т. е. изредка происходят разрывы хромосом в клетках, находящихся в обычных условиях. Но так как спонтанные разрывы относительно редки, то при исследовании хромосомных разрывов и их последствий очень удобно использовать агенты, которые могут давать большое количество разрывов. В этой главе мы ограничимся рассмотрением одного из таких агентов, а именно излучения.

Разрыв хромосомы представляет собой химическую реакцию, требующую затраты энергии. Биохимический результат облучения зависит от типа и количества энергии, выделяемой в ткани. При поглощении излучений с меньшей энергией (таких, как видимый свет) энергия выделяется в виде *тепла*, а в случае излучений с большими энергиями (таких, как ультрафиолетовый свет) энергия выделяется в виде тепла и *возбуждения* атомов. В последнем случае энергия затрачивается на переход электрона в атоме с внутренней орбиты на внешнюю. Чем выше энергия излучения, тем больше вероятность того, что поглощенная энергия приведет к химическому изменению. Так, ультрафиолетовый свет вызывает больше разрывов в хромосомах, чем видимый свет. Излучения с энергиями, большими, чем энергия ультрафиолетового света (рентгеновские лучи и γ -лучи; α - и β -лучи; быстрые электроны, нейтроны, протоны и другие ионизирующие частицы), вызывают разрывы с еще большей вероятностью. Хотя такие проникающие излучения высокой энергии вызывают также нагрев среды и возбуждение атомов, основная часть поглощенной клетками энергии затрачивается на *ионизацию*, что и приводит к наибольшему количеству хромосомных разрывов. Сначала разберемся в том, что такое ионизация и каковы ее последствия, а затем уже посмотрим, как энергия ионизации вызывает разрыв.

Подобно видимому и ультрафиолетовому свету рентгеновские и γ -лучи представляют собой электромагнитные волны; однако они обладают меньшими длинами волн и могут проникать в ткань глубже, чем видимый или ультрафиолетовый свет. При поглощении волны высокой энергии (или при захвате или замедлении быстрой частицы) энергия поглощается атомами среды. Эта энергия может вызвать потерю атомом орбитального электрона, создавая таким образом посредством *ионизации* заряженную частицу, *ион*. Такой электрон, оторванный от атома, вылетает с большой скоростью и может, в свою очередь, отщипнуть орбитальные электроны от других атомов, т. е. ионизировать их. Все потерявшие электрон атомы, естественно, становятся *положительно заряженными ионами*, а атомы, захватившие свободные электроны, — *отрицательно заряженными ионами*. Так как каждый оторванный от атома электрон, в конце концов, будет захвачен другим атомом, то ионы образуются в виде пар. Таким образом получаются *треки* ионных пар, или *треки ионизации*, имеющие часто мелкие ответвления. Длина основного или первичного трека ионизации и его боковых ответвлений, а также плотность распределения ионных пар зависят от вида и энергии излучения. Быстрые нейтроны

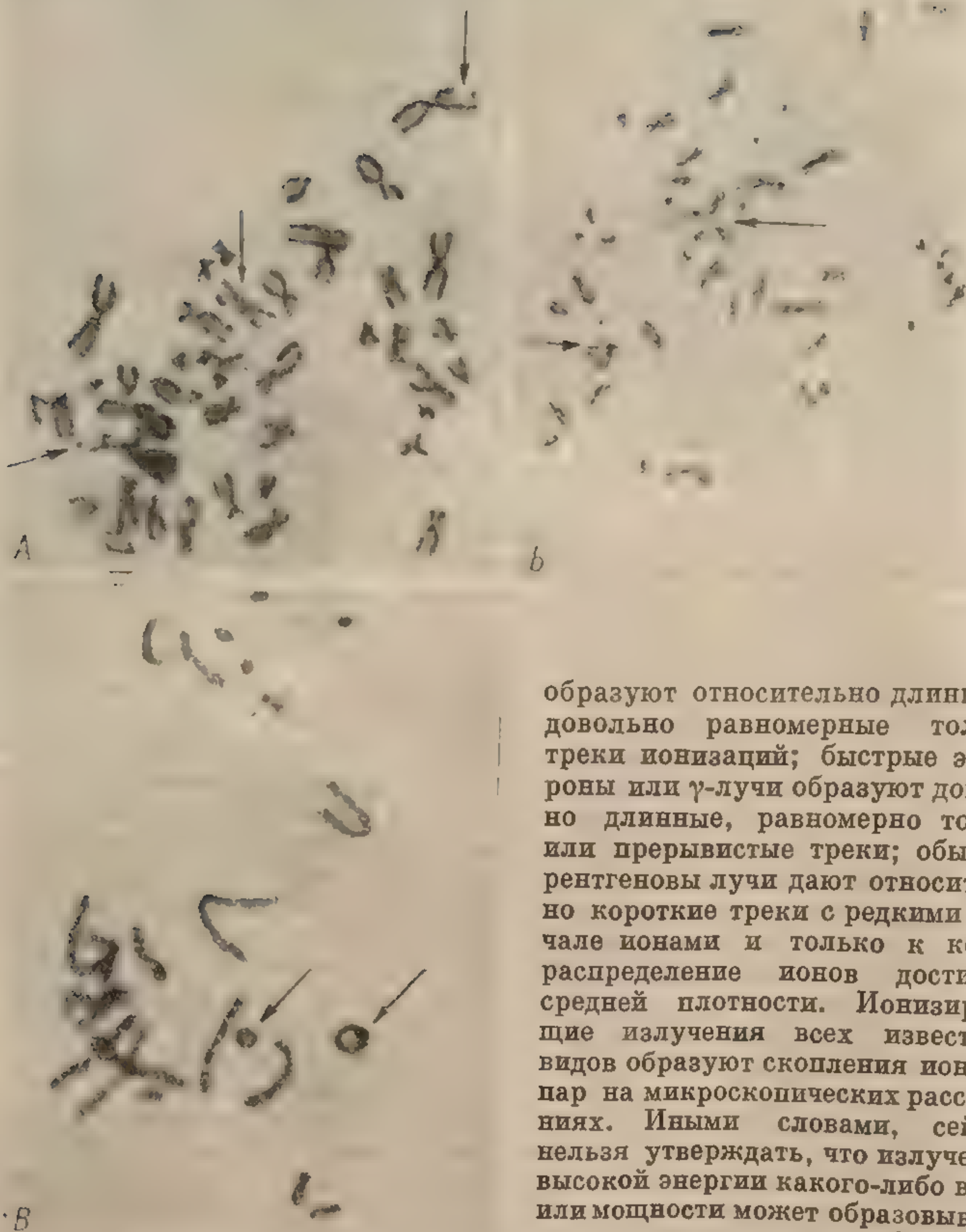


РИС. 13-1.

Структурные изменения фибробластоподобных клеток нормального мужчины, индуцированные рентгеновыми лучами (75—150 p) *in vitro*

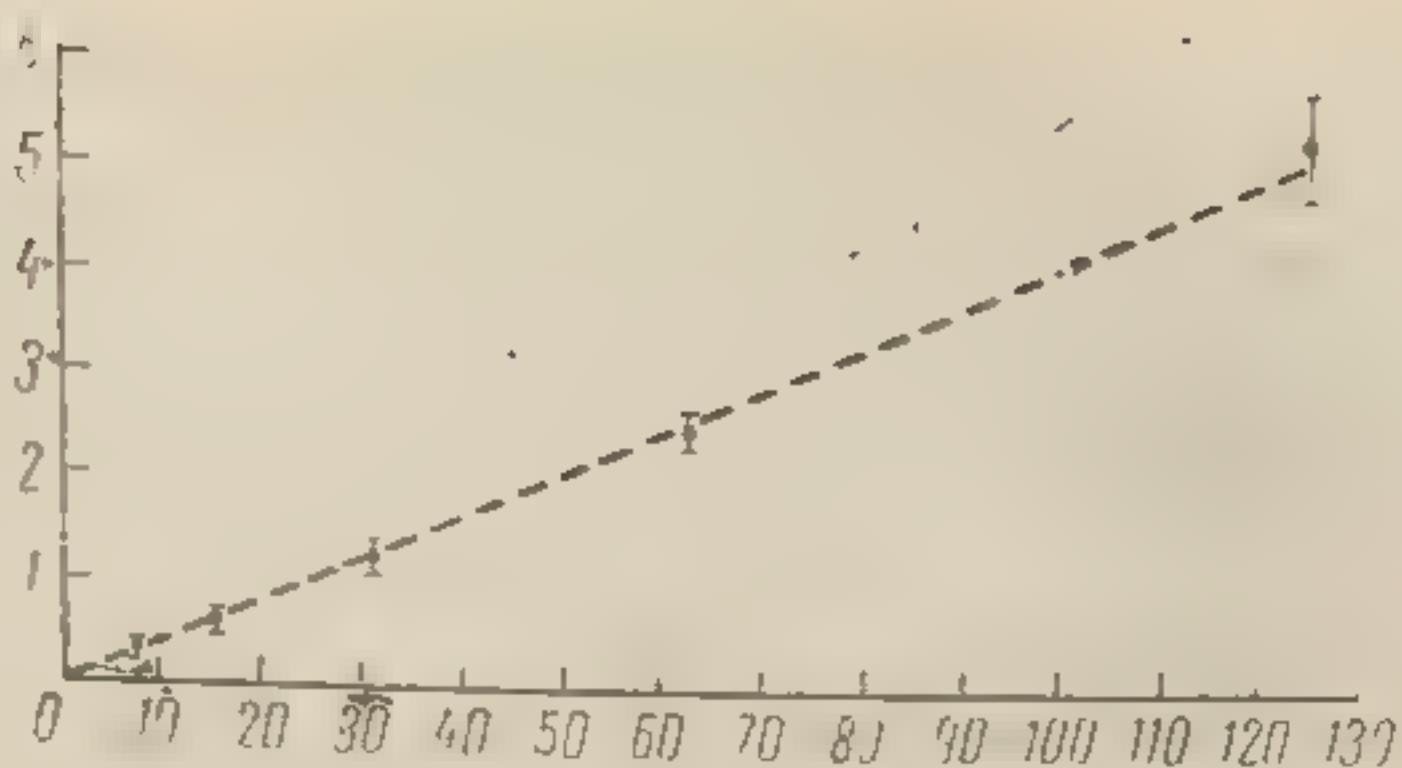
Стрелки показывают: А — разорванные хромосомы, Б — транслокацию (в центре) и дидцентрии (слева ниже), В — кольцевые хромосомы. А и Б находятся в метафазе (см. рис. 11-9); В — в поздней профазе (фото Т. Т. Риска)

образуют относительно длинные и довольно равномерные толстые треки ионизаций; быстрые электроны или γ -лучи образуют довольно длинные, равномерно тонкие или прерывистые треки; обычные рентгеновы лучи дают относительно короткие треки с редкими в начале ионами и только к концу распределение ионов достигает средней плотности. Ионизирующие излучения всех известных видов образуют скопления ионных пар на микроскопических расстояниях. Иными словами, сейчас нельзя утверждать, что излучение высокой энергии какого-либо вида или мощности может образовывать только отдельные ионы (или отдельные пары ионов, равномерно расположенные на сверхмикроскопических расстояниях (и, следовательно, относительно больших). Так как не может быть ионов или пар ионов, достаточно удаленных от других, то генетическое действие излучения должно определяться активностью скопления отрицательно и положительно заряженных ионов. Ионы участвуют в химических реакциях, нейтрализуя свой заряд и достигая более устойчивого состояния. Во время этого

проц
матид
В
назва
в 1 с
мер,
духа,
так к
тельна
лучи
ситель
все из
ции в
сит не
среды,
но в 1
образу
в возду
духе) о
сперми
среднем
ми, 1 p
мия и
только
рад, из
дой. В
тканью,
на нагр
изучени
а не в
Числ
линейно
ность о
торое к
вызвать
суммиро
кам. Ес
при мал
ности вс
разрыв;
больше
излучени
на 1 p, ч
зует бол
но зато в

РИС. 13-2.

Зависимость частоты разрывов, в % (ордината), индуцированных в хромосомах саранчи рентгеновыми лучами, от дозы излучения (абсцисса — доза в p) (J. C. Carlson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1941, 27, 46).



процесса скопление ионов способно вызвать разрыв хромосом или хроматид (рис. 13—1).

Вызванная излучением ионизация измеряется в единицах ионизации, названных *рентгенами* (p). 1 p равен примерно $1,8 \times 10^9$ пар ионов в 1 $см^3$ воздуха. Достаточно жесткое, проникающее излучение (например, быстрые нейтроны), образуя эти $1,8 \times 10^9$ пар ионов в 1 $см^3$ воздуха, может дать такое же количество пар и в следующем 1 $см^3$ воздуха, так как в соответствующем слое вещества поглощается лишь незначительная часть падающего излучения. Если используются рентгеновские лучи не очень высокой энергии («мягкое» рентгеновское излучение с относительно большой длиной волны, называемое также лучами Гренца), то все излучение поглощается у поверхности среды, не производя ионизации в глубине. Количество энергии, выделяемой на любой глубине, зависит не только от энергии падающего излучения, но также и от плотности среды, через которую излучение проходит. Так, в ткани, которая примерно в 10 раз плотнее воздуха, проникающее излучение высокой энергии образует приблизительно в 1000 раз больше пар ионов на 1 $см^3$, чем в воздухе. Зная это, можно вычислить, что 1 p (измеряемый всегда в воздухе) образует около 1,5 ионных пар на 1 μ^3 ткани. Так как объем головки спермия *Drosophila* равен примерно $0,5 \mu^3$, то 1 p может образовать в ней в среднем менее одной пары ионов. Поскольку ионы образуются скоплениями, 1 p может вызвать появление десятков пар ионов в головке одного спермия и ни одного акта ионизации — в других. Единица в 1 p измеряет только ту энергию, которая затрачена на ионизацию; другая единица, *рад*, измеряет полное количество энергии излучения, поглощенное средой. В случае рентгеновых лучей около 90% энергии, поглощаемой тканью, затрачивается на ионизацию; остальные 10% затрачиваются на нагревание среды и возбуждение атомов. Так как ультрафиолетовое излучение не является ионизирующим, то его доза измеряется в *радах*, а не в *рентгенах*.

Число вызываемых рентгеновыми лучами хромосомных разрывов линейно возрастает с дозой облучения (p) (рис. 13—2). Эта пропорциональность означает, что рентгеновы лучи всегда образуют хотя бы некоторое количество скоплений ионов, достаточно больших для того, чтобы вызвать разрыв. Более того, при образовании разрыва не происходит суммирования действия скоплений ионов, принадлежащих разным трескам. Если бы такое суммирование существовало, то частота разрывов при малых дозах должна была быть меньше наблюдаемой в действительности вследствие неэффективности малых скоплений, неспособных вызвать разрыв; частота же разрывов при больших дозах должна была бы быть больше вследствие взаимодействия таких скоплений. Некоторые виды излучений, например быстрые нейтроны, образуют меньше разрывов на 1 p , чем рентгеновы лучи, потому что 1 p таких излучений образует большие по размерам скопления ионов, чем рентгеновские лучи, но зато в меньшем количестве. Эти большие скопления чаще превышают

размер, необходимый для образования разрыва, и поэтому в этом отношении менее эффективны.

Скопления ионов могут образовывать разрывы, либо, воздействуя непосредственно на хромосому, либо непрямо, воздействуя на молекулы, в состав которых входит кислород (которые, в свою очередь, реагируют с хромосомой), или на другие химические вещества (которые, в свою очередь, влияют на хромосомы или на содержащие кислород молекулы). В любом случае такой не прямой путь должен иметь субмикроскопическую длину; в противном случае при образовании разрывов могла бы происходить сумма действия разных скоплений ионов. Следовательно, разрыв хромосомы могут вызвать только скопления ионов в самой хромосоме или вблизи нее. Это было четко показано при использовании микропучков проникающего излучения. Такой пучок может разорвать метафазную хромосому, если он проходит через нее, но не может вызвать разрыва, проходя через цитоплазму рядом с хромосомой.

На основании всего сказанного естественно предположить, что количество разрывов, вызываемых действием некоторой дозы определенного излучения, зависит от объема, занимаемого хромосомой. Этот объем различен в разные моменты ядерного цикла (он меняется, например, во время репликации хромосомы). Вследствие изменения степени полиемии или активности генов одна и та же хромосома может занимать разные объемы в разных тканях организма; объем одной и той же половой хромосомы может быть различным у разных полов. Так как разрыв требует затраты энергии, то разумно также предположить, что число разрывов, образуемых за счет непрямого действия, возрастает, если во время облучения увеличивается содержание кислорода или если блокированы восстанавливающие вещества клетки. И, наоборот, замещение на время облучения кислорода азотом снижает количество образуемых разрывов.

После такого предварительного рассмотрения некоторых факторов, влияющих на возникновение вызванных облучением разрывов, можно уже обратиться и к факторам, влияющим на судьбу образующихся при разрыве концов. Как и при разрыве, при соединении «липких» концов происходит химическая реакция. По-видимому, для соединения образовавшихся при разрыве концов необходимо наличие аденозинтрифосфата и синтез белка (I. G. Brewen, 1963). Соединение усиливается, если после облучения в среде присутствует кислород (и подавляется в присутствии азота). Соответственно, восстановления не происходит, если после облучения кислород заместить азотом. При этом увеличивается время, в течение которого концы одного и того же разрыва остаются открытыми и соответственно увеличивается вероятность перекрестного соединения при последующей подаче кислорода. (Отметим, что наличие кислорода влияет на частоту перестроек в двух противоположных направлениях — кислород во время облучения увеличивает число разрывов, а после облучения — усиливает восстановление.)

Так как при одинаковых условиях количество разрывов растет линейно с дозой ионизации и каждая часть дозы независимо вызывает пропорциональное ей число разрывов, то ясно, что число образованных разрывов также не зависит от мощности дозы, т. е. от времени, за которое дается полная доза. Отсюда следует, что и все вызванные единичными разрывами структурные изменения хромосом тоже не зависят от мощности дозы. При воздействии таких излучений, как быстрые нейтроны, которые образуют длинные треки с плотной ионизацией, одна частица может вызывать два хромосомных разрыва. В этом случае, если одна и та же туго скрученная хромосома дважды разорвана из-за того, что ее два раза пересек трек от одной и той же частицы, то могут возникнуть большие или меньшие структурные изменения типа инверсии, нехватки

или дупликации. Частота таких перестроек линейно растет с дозой быстрых нейтронов и не зависит от мощности дозы.

Один быстрый нейтрон, образуя отдельный трек ионов, может также разорвать две разные хромосомы, если они лежат близко друг к другу, как, например, в головке спермия. Обнаруженный при облучении спермиев быстрыми нейтронами линейный рост с дозой частоты реципрокных транслокаций позволяет сделать заключение (уже упомянутое в главе 12), что близость «клеяких» концов благоприятствует их соединению. Такая линейная зависимость эффекта от дозы может наблюдаться только в том случае, если оба разрыва вызваны одним и тем же треком, а способные перекрестно соединиться концы разрывов расположены недалеко друг от друга; концы разрывов, образованных треками от разных частиц, оказываются расположенными слишком далеко друг от друга.

Однако для обычных рентгеновых лучей скопления ионов меньше, а треки короче, чем для быстрых нейтронов. Соответственно, реже происходит образование двух разрывов в одной хромосоме одним треком ионов от рентгеновского излучения, а если это и происходит, то такие разрывы обычно расположены вплотную друг к другу. Заметим, однако, что два разрыва, которые произошли на субмикроскопическом расстоянии один от другого в соседних кольцах спирализованной хромосомы, приводят лишь к крайне незначительным структурным изменениям. Тем не менее, небольшая доля отдельных треков рентгеновского излучения, например, при облучении спермиев должна вызывать два разрыва, расположенных в разных хромосомах. Поэтому для тех доз рентгеновых лучей, которые вызывают менее двух треков на спермий, частота больших хромосомных перестроек возрастает с дозой линейно. Итак, фактически нет дозы рентгеновского излучения, которая бы с некоторой вероятностью не вызывала бы появления большой перестройки. Другими словами, независимо от того, насколько мала доза ионизирующего излучения, всегда существует вероятность поломки хромосомы и большой хромосомной мутации.

В случае воздействия рентгеновых лучей или быстрых электронов два разрыва в одном ядре возникают обычно в результате действия двух скоплений ионов, относящихся к разным независимым трекам, так что каждый разрыв индуцируется независимо от другого. Большие двухразрывные перестройки такого происхождения, индуцированные рентгеновыми лучами или быстрыми электронами, зависят от дозы, так как, если дается достаточно малая доза, то ядро пересекается только одним треком и могут произойти лишь одноразрывные (но не двухразрывные) большие перестройки. Однако, если доза достаточно велика, так что ядро пересекается двумя разными треками, то могут независимо произойти два разрыва, необходимые для больших двухразрывных перестроек. Поэтому чем выше доза рентгеновых лучей, тем больше эффективность образования больших многоразрывных перестроек, вызванных разрывами, независимо индуцированными разными треками. Соответственно, для доз, при которых в некоторых исследуемых клетках получают два независимо возникающих разрыва, и для еще более высоких доз частота таких мутаций возрастает быстрее, чем прямо пропорционально дозе. Одним из примеров служит экспоненциальный рост частоты реципрокных транслокаций с увеличением дозы, наблюдаемый при облучении спермиев в семяприемниках самок *Drosophila* быстрыми электронами (рис. 13—3, кривая T).

Индуцированные рентгеновским излучением перестройки, которые получают при двух (или более) разрывах, вызванных разными треками, зависят также от темпа облучения, т. е. от мощности дозы. Если достаточно большая доза дается за короткий промежуток времени, то в клетке одновременно имеются концы, образовавшиеся при разных разрывах,

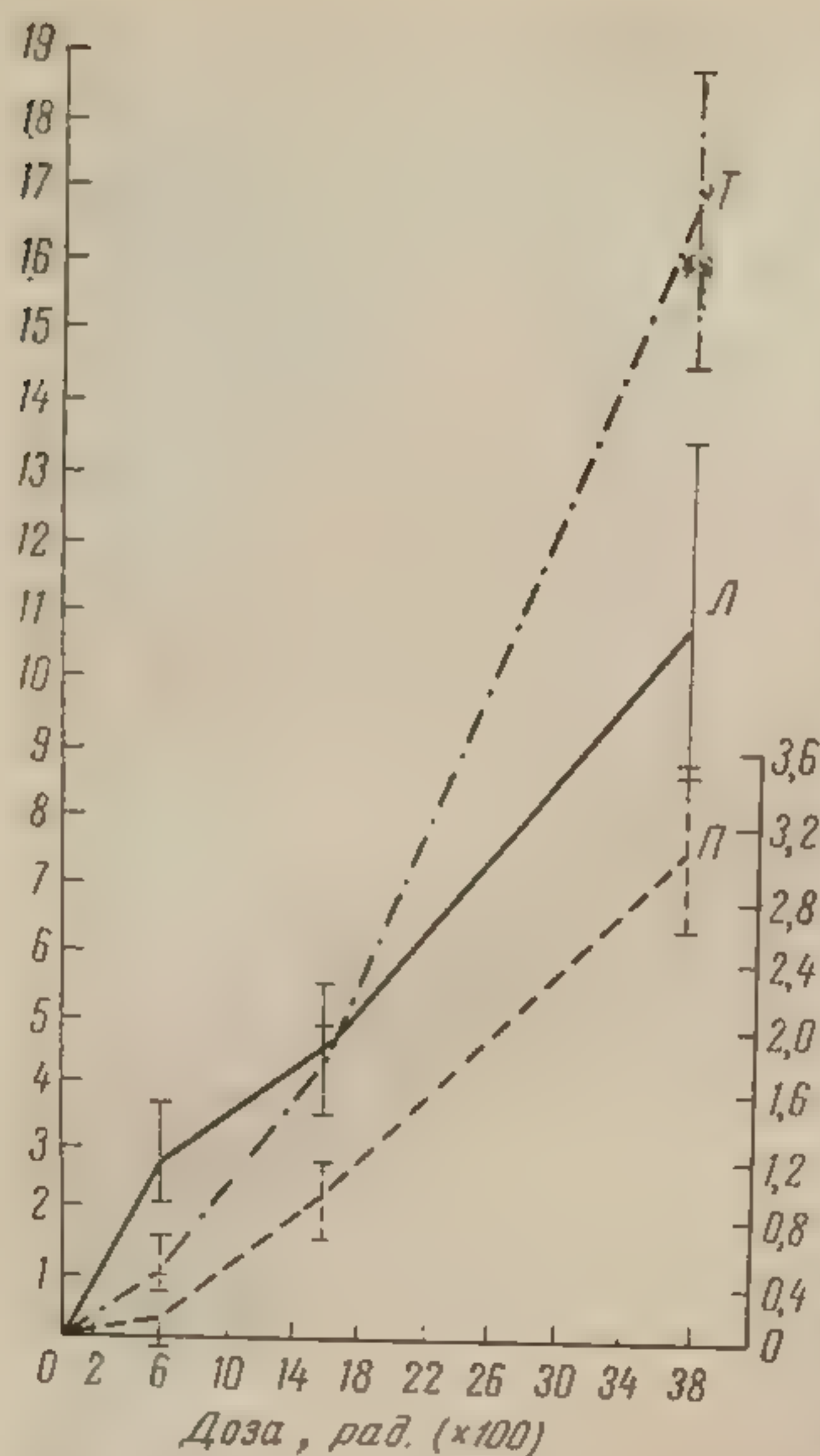


РИС. 13-3.

Процент мутаций ($\pm 2 \times$ стандартная ошибка), полученных после облучения спермиев дрозофилы различными дозами электронов с энергией 18 Мэв.

Частоты рецессивных леталей, сцепленных с полом (L, соединены сплошной линией), даны с поправкой на их частоту в контроле. Частоты утраты половых хромосом (II) соединены пунктиром; из них вычтены частоты утраты в контроле. Частоты реципрокных транслокаций (T) между хромосомами II и III соединены штрих-пунктирной линией. L и T — шкала слева, II — шкала справа (I. H. Herskowitz и др., Genetics, 1959, 44, 326)

такие, например, как наличие или отсутствие ядерной мембраны, степень спирализации хромосом, напряжение или натяжение в разных частях хромосомы, степень гидратации, количество матрикса, в который вкраплены гены, вязкость цитоплазмы и ее токи, особенно ее движение около хромосом, сила тяжести, центробежная сила и вибрация.

В клетках с уже поделившимися хромосомами, а также в тех клетках, в которых гомологичные хромосомы находятся в синапсисе, когда разорваны только некоторые из противоположащих нитей, движение фрагментов пространственно ограничено (см. стр. 178—180). В этом случае силы, удерживающие участки одной нити рядом с соответствующими участками сестринской или гомологичной нити, могут препятствовать свободному расхождению разорванных фрагментов, так что неразорванная нить или нити служат как бы лубком для разорванной (разорванных) и снижают вероятность перекрестного соединения. Следовательно, имеется много факторов, определяющих, насколько могут расходиться хромосомные или

и может происходить их перекрестное соединение. Но если та же доза дается за большее время, то фрагменты от первого разрыва могут воссоединиться до того, как возникнет второй разрыв, что исключает возможность перекрестного соединения. В результате одна и та же доза приводит к меньшему количеству больших перестроек в тех случаях, когда она дается растянуто во времени, а не концентрированно. Такая зависимость от мощности рентгеновского облучения подтверждается для большинства клеток (по крайней мере во время части интерфазы), однако она не наблюдается в зрелых спермиях животных, возможно включая человека. В этих гаметах, а также в течение большей части времени деления ядра в других клетках разорванные фрагменты не могут соединиться друг с другом (см. стр. 178—180) и поэтому происходит их накопление. Так как разрывы остаются несоединенными по крайней мере до тех пор, пока головка спермия не набухнет после оплодотворения, то безразлично, за какое время — быстро или медленно — были облучены данной дозой хромосомы в головках спермиев.

Как уже указывалось, на число разрывов и типы получающихся структурных изменений влияет расположение хромосом в пространстве друг относительно друга. Следует отметить, что вероятности множественных разрывов и соединений совершенно различны для хромосом, лежащих плотно друг к другу в крошечной головке спермия и для хромосом, находящихся в большом ядре. Но даже и внутри одного типа клеток на разрыв и соединение могут влиять многие другие факторы,

хромат
яющие
хромос
хромос
ность

Час
нений
чества
и от чи
хромос
в разн
органи
диплои
ки, явл
ными, в
ликаци
тивны.

Изл
мосомы
повреж
клетки,
функци
Если к
следстви
турных
дений, т
доза ра
ром слу
Клетки,
деления
середин
интерфа
синхрон
ляция со
то хромо
ны в за
времени

Эухро
разной с
ний. Об
нием, ча
вые. Нел
легче рв
с обычно
ровать д
ни было
положен
из причи
целого п

Необх
ностью р
дующими
количест
многих ф
изучении
открытия
1) гене

хроматидные фрагменты. Факторы, влияющие на расстояния между разными хромосомами или между частями одной хромосомы, влияют также и на вероятность разрыва хромосом и хроматид.

Частота и типы структурных изменений зависят также от общего количества хромосомного материала в ядре и от числа и размера составляющих его хромосом. Перестройки, происходящие в разных клетках одного и того же организма, зависят от того, гаплоидны, диплоидны или полиплоидны эти клетки, являются ли хромосомы полинемыми, находятся ли они в процессе репликации или же они метаболически активны.

Излучение может оказать на хромосомы сильное немутагенное действие, повреждая нехромосомные компоненты клетки, которые влияют на судьбу и функциональную активность хромосом. Если клетки способны устранять последствия таких нехромосомных структурных или функциональных повреждений, то у них будет больше времени для восстановления, когда та же доза радиации дается медленно, а не быстро. Наиболее ясным примером служит действие облучения на митоз (возможно, и на мейоз). Клетки, будучи облучены в средней профазе и на более поздних стадиях деления ядра, обычно заканчивают митоз. Клетки, еще не достигшие середины профазы, будучи облучены, часто возвращаются обратно в интерфазу. Поэтому ионизирующее излучение приводит к увеличению синхронности делений. Соответственно, если в начале облучения популяция состоит из клеток, находящихся на разных стадиях деления ядра, то хромосомные мишени для мутаций к концу облучения будут различны в зависимости от того, как дается одна и та же доза — растянуто во времени или концентрированно.

Эухроматиновые и гетерохроматиновые участки хромосомы обладают разной способностью к образованию обнаружимых структурных изменений. Обнаруженные структурные изменения, индуцированные облучением, чаще затрагивают гетерохроматиновые участки, чем эухроматиновые. Нельзя определить, чем вызвано это различие: или гетерохроматин легче рвется, или он хуже восстанавливается (что может быть связано с обычной способностью различных участков гетерохроматина конъюгировать друг с другом), или же существенны оба эти фактора. Как бы то ни было, при многих перестройках по крайней мере один разрыв расположен в гетерохроматине вблизи центромера. Здесь кроется одна из причин того, что чаще всего наблюдаются реципрокные транслокации целого плеча.

Необходимость приведенных выше рассуждений определяется способностью радиации индуцировать большое количество разрывов с последующими структурными изменениями. Легкость получения большого количества перестроек при облучении сделала возможным открытие многих факторов, влияющих на процессы разрыва и соединения. При изучении структурных изменений были сделаны и многие другие важные открытия; в частности, установлены:

1) генетическая природа центромера;

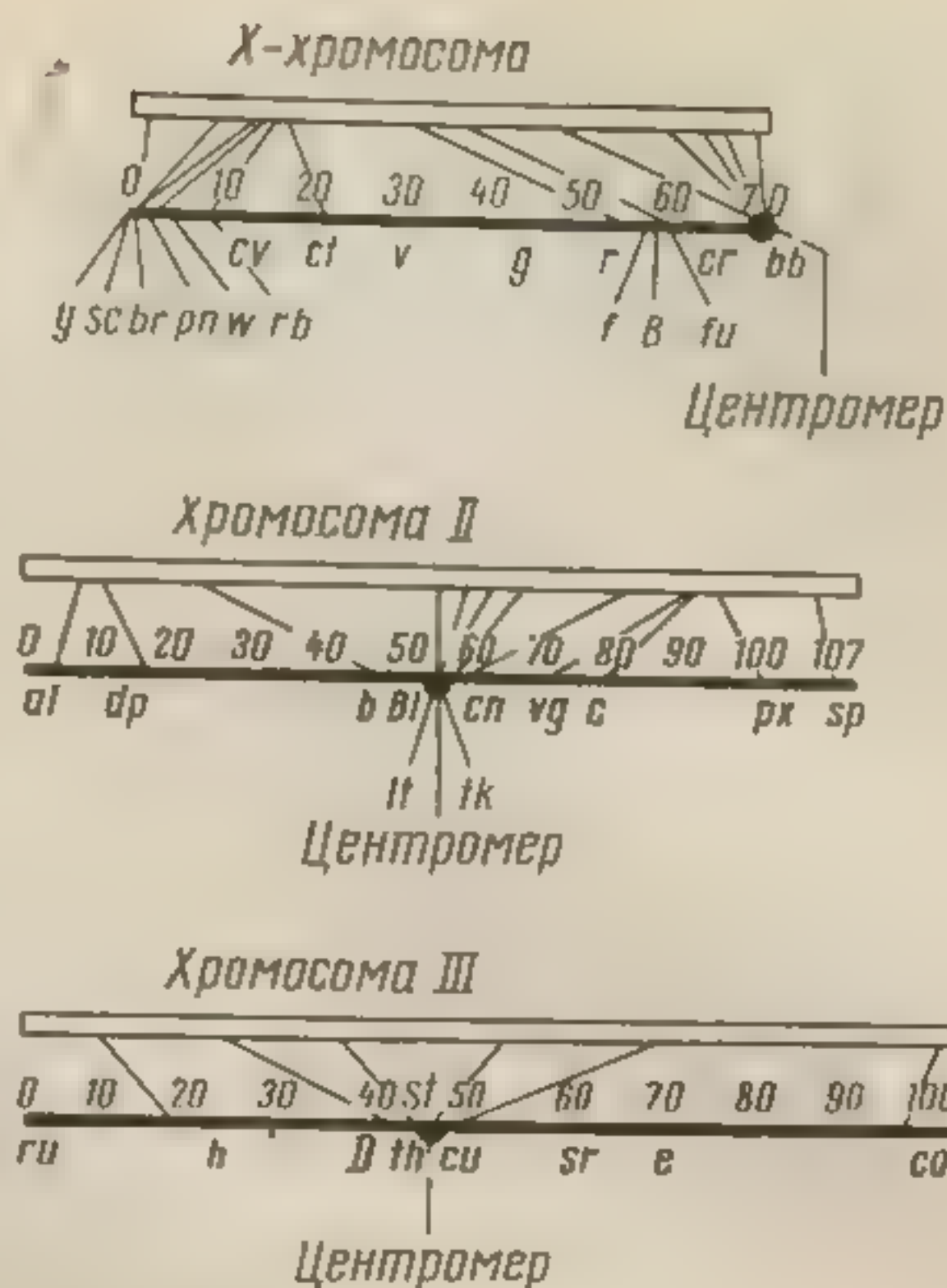


РИС. 13-4.

Сравнение хромосомной (незачерненная полоса) и кроссоверной (зачерненная полоса) карт *D. melanogaster*.



ЛЬЮИС ДЖОН СТАДЛЕР
(1896—1954) известен
своими работами о при-
роде мутирования и гена.
Он и Г. Мёллер независи-
мо друг от друга откры-
ли мутагенное действие
рентгеновых лучей (Gene-
tics, 1956, 41, 1)

- 2) пониженная частота перекреста вблизи центромера;
- 3) генетическая природа теломера;
- 4) существование у некоторых видов вблизи центромера генетических элементов (*коллохор*), которые особенно важны для синапсиса (K. W. Cooper, 1964).

Наиболее значимым, возможно, было открытие посредством изучения структурных изменений того факта, что гены в хромосоме (на *хромосомных картах*) имеют тот же линейный порядок, что и на кроссоверных картах. Однако расстояния между ними на этих картах различны (рис. 13—4). Так, например, из-за снижения частоты перекреста вблизи центромера ближайшие к центромеру гены на кроссоверной карте находятся поблизости, хотя на карте метафазной хромосомы они расположены далеко друг от друга.

Несмотря на то, что мы ограничились рассмотрением факторов, влияющих на образование и соединение разрывов, вызванных ионизирующим излучением, нужно ожидать, что эти же факторы влияют и на разрывы, вызываемые с помощью любого другого спонтанного или индуцированного механизма. В общем, независимо от того, как они получились, все разорванные хромосомы обладают одинаковыми свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Составные элементы структурного изменения хромосомы, разрыв и перекрестное соединение легко исследовать, используя ионизирующие излучения. Эти излучения вызывают разрыв хромосомных нитей с помощью образуемых ими скоплений пар ионов. Эти скопления составляют треки ионов, длина и толщина которых определяет число и расположение разрывов. Для того, чтобы хромосома разорвалась, трек ионов должен пройти через нее или очень близко от нее.

Числ
хромосо
заций, н
линейно
говой до
во време
чения, к
единичн

Двух
ния выз
треков, к
во время
разрыве
нии дава

Как п
химическ
мости от
типы пер
ния хром
рохромати
чия или
на которо
от внекле

ВОПРОСЫ

- 13.1. П
только в
ионов, че
- 13.2. К
разрыв хр
средственн
- 13.3. О
зисимости
ните.
- 13.4. С
рентгеновс
чем если о
- 13.5. О
и в измен
- 13.6. С
корабле мо
Объясните.
- 13.7. Об
рентгеновы
изменений
- 13.8. Ка
ность ультр
- 13.9. Ср
и той же д
а) в пол
б) в дип
в) в спе
- 13.10. О
ту мутаций,

Число разрывов линейно растет с дозой облучения. Число любых хромосомных перестроек, индуцированных единичными треками ионизации, независимо от того, вызваны ли они одним или двумя разрывами, линейно возрастает с дозой облучения; их возникновение не имеет пороговой дозы; на них не влияет растягивание или концентрирование дозы во времени. Соответственно, не существует дозы ионизирующего излучения, которая не образовывала бы разрывов и хотя бы индуцированных единичными треками перестроек.

Двухразрывные (и с большим числом разрывов) структурные изменения вызываются скоплениями ионов разных, независимо возникших треков, и их частота растет быстрее дозы и имеет пороговую дозу. Если во время облучения может происходить соединение получившихся при разрыве концов, то частота таких перестроек снижается при растягивании даваемой дозы радиации во времени.

Как процесс разрыва, так и процесс соединения включают в себя химические изменения; поэтому их частоты могут изменяться в зависимости от состояния метаболизма клетки. Совершенно очевидно, что все типы перестроек должны зависеть от физического и химического состояния хромосомы; от количества и расположения в ней эухроматина и гетерохроматина; от числа и расположения имеющихся хромосом; от наличия или отсутствия ядерной мембраны; от движения концов разрыва, на которое влияют клеточные органеллы и токи цитоплазмы, и, наконец, от внеклеточных факторов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

13.1. Почему после одинакового облучения в ткани, которая примерно только в 10 раз плотнее воздуха, содержится почти в 1000 раз больше ионов, чем в воздухе?

13.2. Какое можете Вы привести подтверждение тому, что, вызывая разрыв хромосомы, ионы не обязательно всегда взаимодействуют непосредственно с нею?

13.3. Означает ли наблюдаемое изменение объема хромосомы в зависимости от условий, что содержание генов в ней непостоянно? Объясните.

13.4. Считаете ли Вы, что вероятность структурных изменений при рентгеновском облучении больше, если хромосомы плотно спирализованы, чем если они относительно деспирализованы? Почему?

13.5. Обсудите роль гетерохроматина в изменениях числа хромосом и в изменениях формы хромосом.

13.6. Считаете ли Вы, что содержание кислорода в космическом корабле может повлиять на мутабельность находящихся в нем дрозофил? Объясните.

13.7. Обсудите относительную эффективность, в расчете на 1 р, рентгеновых лучей и быстрых нейтронов в образовании структурных изменений хромосом.

13.8. Как Вы думаете, не угрожает ли выживанию людей мутагенность ультрафиолетового света? Объясните.

13.9. Сравните число и судьбу разрывов, индуцированных одной и той же дозой рентгеновых лучей:

- а) в полиплоидной и диплоидной клетках печени человека;
- б) в диплоидном нейроне человека и дрозофилы;
- в) в спермии и сперматогонии человека.

13.10. Обсудите влияние немутагенного действия облучения на частоту мутаций, индуцированных при последующем облучении.

13.11. Обсудите, используя рис. 13—4, вероятность перекреста в различных участках X-хромосомы *D. melanogaster*.

13.12. Сравнить единицы рентген и рад.

13.13. Какая специфическая сторона окружающей нас сейчас среды имеет тенденцию уменьшать число индуцируемых ионизирующим излучением мутаций по сравнению с числом мутаций, которые могли быть индуцированы в то время, когда человек только возник?

ЛИТЕРАТУРА

- З. Бак, А. Александер. Основы радиобиологии. Перев. с англ. М., ИЛ, 1963.
- M. A. Bender and P. C. Gooch. Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 522.
- J. G. Brewen. Dependence of frequency of X-ray-Induced chromosome aberrations on dose rate in the Chinese Hamster.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 322.
- E. H. Y. Chu, N. H. Giles and K. Passano. Types and frequencies of human chromosome aberrations induced by X-rays.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 830.
- K. W. Cooper. Meiotic conjunctive elements not involving Chiasmata.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1248.
- Ionizing radiation.— Scient. Amer., 1959, 201.
- H. J. Muller. General survey of mutational effects of radiation. In: «Radiation biology and medicine», W. D. Claus (Ed.). 1958, Chap. 6, p. 145.
- T. T. Puck. Radiation and the human cell.— Scient. Amer., 1960, 202, 142.
- F. H. Sobels. Repair from Genetic Radiation. N. Y., 1963.
- A. H. Sparrow, J. P. Binnington and V. Pond. Bibliography on the effects of ionizing radiations on plants, 1896—1955. Brookhaven Nat. Lab. Publ., 1958, 504 (L-103).

Мы у
отдел
можн
Возм
цион
циях
ны в
генно
Вс
певал
ное ра
генов
щего
предст
зывает
местах
цию, и
генами
объект
никогд
сущест
биолог
«Ли
свидет
генов.
концы,
«нелип
ности
ного т
теломе
ных ко
Хро
ляет со
Наприм
в поло
когда я
разрыва
которых
Это нор
тому, ч
центром
клетке
хромосо
прессир
только
приписа
и половь

ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ

Мы уже знаем, что единицей мутации генотипа может быть целый геном, отдельная хромосома или часть хромосомы. Изучение этих единиц, возможно, откроет какие-нибудь мутационные свойства отдельного гена. Возможно, свет на эту область исследований прольют также рекомбинационные свойства отдельных генов. Посмотрим, что уже известно о мутациях отдельных генов — подобные мутации, вероятно, наиболее существенны в эволюции, так как они влекут за собой лишь небольшое изменение генного баланса.

Все хромосомы линейны и не разветвлены независимо от того, претерпевали ли они перестройки при кроссинговерах или разрывах. Это линейное расположение может быть обусловлено либо непосредственной связью генов друг с другом, либо наличием негенетического материала, связывающего соседние гены. В любом случае, несомненно, что хромосома всегда представляет собой палочку или кольцо. Это почти неопровержимо доказывает, что ген не может быть соединен с другими генами более чем в двух местах и что нельзя получить спонтанно или индуцировать такую мутацию, которая допускала бы соединение гена более чем с двумя другими генами. Мутации такого типа не наблюдались никогда ни для одного объекта исследования. На этом основании можно считать, что либо гены никогда не обладали таким свойством, либо это свойство утрачено всеми существующими генами. Следовательно, все интерстициальные гены *биполярны*, и мутация не может придать гену более двух полюсов.

«Липкость» новых концов, образующихся при разрыве хромосомы, свидетельствует о том, что почти все мутации сохраняют биполярность генов. Однако известно, что в некоторых относительно редких случаях концы, получившиеся при разрыве (*концы разрыва*), становятся навсегда «нелипкими», или *закисленными*, так что произошла мутация из биполярности к униполярности. Способность мутации превращать гены биполярного типа в гены *униполярного* типа доказывается также существованием теломер — униполярных генов, служащих для «запечатывания» нормальных концов хромосом.

Хромосомное изменение из биполярности к униполярности представляет собой обычное явление в жизненном цикле некоторых животных. Например, у некоторых видов круглого червя *Ascaris* ядра, остающиеся в половых клетках, обладают единственной парой хромосом. Однако, когда ядро впервые оказывается в соматической клетке, эти хромосомы разрываются на несколько небольших линейных фрагментов, концы которых запечатаны и которые обычным образом ведут себя при митозе. Это нормальное поведение в митозе становится возможным благодаря тому, что хромосома половой клетки имеет по своей длине несколько центромер (каждый выживающий фрагмент хромосомы в соматической клетке содержит по крайней мере один центромер). В *полицентрической* хромосоме половой клетки все центромеры, за исключением одного, зарепрессированы. Так как фрагментация хромосом у *Ascaris* происходит только в соматических клетках, то эти изменения полярности можно приписать некоторому физиологическому различию между соматическими и половыми клетками. Эти изменения полярности нужно считать скорее

событиями рекомбинационными, чем мутационными, так как изменения из биполярности к униполярности происходят одновременно в большом числе клеток; кроме того, при этом отсутствует присущая мутациям новизна.

Мутации, превращающие биполярность в униполярность, несомненно, имеют место, однако никогда не сообщалось о достоверном обратном процессе, т. е. о мутации из униполярности в биполярность. Так как вероятность обнаружения и доказательства изменения из уни- к биполярности в действительности очень мала, то нельзя пока с уверенностью отрицать возможности такого изменения. Могут ли происходить мутации к неполярности? Очевидно, что перешедший в результате мутации в неполярное состояние уни- или биполярный ген обязательно должен выпасть из хромосомы. Если это произошло, то свободный, ни к чему не «приклеенный» ген не будет сцеплен ни с одной из хромосом. Так как до сих пор не было указаний на существование генетического материала, который высвобождался бы таким способом из своего локуса в хромосоме, то нельзя утвердительно ответить на этот вопрос.

Ген был впервые идентифицирован при исследовании особей, размножающихся половым путем, у которых хромосомы конъюгируют во время мейоза. Синапсис происходит в результате притяжения между разными сегментами одной или более хромосом. На существование различной степени специфического притяжения между генами указывает тот факт, что гены, находящиеся в гетерохроматине, конъюгируют менее специфичным образом, чем гены эухроматина. Известны особые гены (например, один из генов кукурузы, названный *асинаптическим*), у которых нет не только специфического притяжения между их аллелями, но которые даже мешают такому притяжению между парами генов в других локусах или приводят к общему нарушению конъюгации. В главе 13 уже упоминалось о существовании коллохор — генов, которые содействуют конъюгации. Соответствующие локусы эухроматина, расположенные в гомологичных хромосомах, конъюгируют друг с другом независимо от того, идентичны или различны содержащиеся в них аллели. Однако эухроматиновые гены в негомологичных хромосомах обычно не конъюгируют друг с другом, хотя и считается, что некоторые ныне неаллельные гены ранее были аллельными. Следовательно, мутация должна быть способной изменить синаптическую специфичность гена; нужно сделать вывод, что обычно идентичные гены притягиваются друг к другу сильнее, чем неидентичные.

По крайней мере некоторые гены обладают множественными аллелями; отсюда ясно, что существуют разные формы гена, и мутации таких генов нельзя объяснить просто их полной утратой или инактивацией. Некоторые мутации не дают видимого изменения рисунка дисков хромосом слюнных желез *Drosophila*; следовательно, мутации, затрагивающие только отдельный ген, т. е. *генные мутации*, могут быть субмикроскопическими. Пока мы можем обнаружить генную мутацию только по производимому ею изменению фенотипа. Следовательно, свойства генной мутации должны быть определены исходя из изменений фенотипа, производимых генами, найденными при помощи рекомбинаций. Соответственно, по таким изменениям фенотипа мы не можем определить, затрагивает ли генная мутация рекомбинационный ген *in toto*, или только его часть, или сайт, или же много разных сайтов в нем. Если генная мутация приводит к изменению всего гена, то материальный состав генов, определяемый с помощью рекомбинаций и с помощью мутаций, должен быть идентичен. С другой стороны, если определяемый по рекомбинациям ген содержит один или несколько сайтов, в которых произошли мутации, то элементарная единица рекомбинации генетического материала должна быть больше элементарной единицы мутации. Пока нет данных, на основании которых можно было сделать окончательный выбор между этими двумя альтернативами,

и мы будем по-прежнему считать мутационный и рекомбинационный гены материально эквивалентными в соответствии с законом экономии (см. глава 3, стр. 43).

Как уже отмечалось в главе 1, любой ген довольно стабилен и до тех пор, пока в нем не произойдет обнаруживаемая мутация, он проходит многие тысячи правильных репликаций. Однако, чем выше чувствительность наших методов обнаружения мутаций, тем больше частота наблюдаемых мутаций (вспомните об обнаружении изоаллелизма, стр. 67). Поэтому естественно принять, что существуют способные наследоваться модификации отдельных генов, которые ускользают от нас при использовании современных методов их обнаружения. Тем не менее, учитывая наши возможности, представляется правильным считать, что ген весьма устойчив.

Рассмотрим ниже следующий метод получения информации о мутировании гена. Отбираются и затем изучаются все мутанты, у которых затронут один или несколько изучаемых генов. Относительно некоторых мутаций, затрагивающих данный локус, доказано, что в их основе лежат изменения числа целых хромосом. Для других показано, что они связаны с большими или малыми хромосомными перестройками. Все эти мутации исключаются из дальнейшего рассмотрения, даже если вместе с такими изменениями происходили и генные мутации. Насколько это возможно, применяют все генетические и цитологические тесты, чтобы исключить мутации с мельчайшими хромосомными перестройками (например, микродупликации и микроделеции). Затем считают — за недоказанностью обратного — что все или хотя бы значительная часть оставшихся мутантов получились в результате мутаций, затрагивающих либо отдельный ген (генные мутации), либо лишь небольшое количество генов (*межгенные мутации*). При этом каждый из оставшихся мутантов ведет себя так, как если бы он возник в результате изменения одной точки на кроссоверной и цитологической картах; поэтому такие мутации были названы *точечными*. Так как в этом случае у нас нет критерия, с помощью которого можно было бы различать мутации, затрагивающие только один ген (включая его полную утрату), и мутации, затрагивающие небольшое количество генов, то придется изучать весь гетерогенный класс точечных мутаций в надежде выявить некоторые характеристики генной мутации.

Рассмотрим теперь некоторые свойства спонтанных и индуцированных точечных мутаций. Так как точечные мутации возникают в огромном количестве различных генов, то этот процесс не ограничен каким-либо очень узким типом генов.¹ Условия, вызывающие точечные мутации, могли бы быть такими, что в диплоидной клетке одновременно стремились бы мутировать оба члена аллельной пары; однако в действительности мутация происходит только в одном гене пары. Так как мутирует только один член пары генов в ядре, то точечная мутация должна быть явлением, очень ограниченным в пространстве, субмикроскопическим.

Если бы точечная мутация заключалась обычно либо в серии изменений стабильного гена, либо в нестабильности гена в течение более чем одной клеточной генерации, то мутанты должны были бы возникать группами, и в одной группе не обязательно один и тот же ген должен был бы всегда мутировать в один и тот же аллель. Однако многие точечные мутанты возникают поодиночке. Более того, те из них, которые возникают группами, часто оказываются идентичными. Существование таких групп можно обычно объяснить, допустив, что та единственная клетка, которая претерпела мутацию, успела несколько раз поделиться до того, как было проведено испытание для обнаружения мутантов. Хотя такие данные и не доказывают того, что точечная мутация происходит мгновенно, они все же свидетельствуют о том, что процесс ее образования обычно завершается за одно клеточное поколение, и в этом отношении изменение происходит скорее мгновенно, чем постепенно. Однако число точечных мутаций, полу-

ченных после облучения рентгеновыми или ультрафиолетовыми лучами, снижается, если сразу после облучения воздействовать видимым светом или некоторыми химическими веществами (но не в том случае, если это воздействие происходит через несколько часов после облучения). Такая обработка непосредственно после облучения приводит к *фото-* или *хемо-* *восстановлению* и доказывает, что процесс возникновения точечной мутации часто не завершается в течение нескольких минут. Определенные химические изменения, которые сами по себе могут быть, а могут и не быть мутационными, могут привести к другим генетическим изменениям, например, к разрывам. Если первое изменение устраняется до того, как оно вызвало второе, то наблюдается избавление от мутации. Только после того, как процесс возникновения точечной мутации завершился, новое состояние гена становится таким же устойчивым, как и старое.

Точечные мутации почти столь же стабильны, как и их родительские гены или другие гены генотипа; однако не следует считать, что все аллельные и неаллельные гены имеют одну и ту же частоту возникновения спонтанных мутаций. Изучение специфических локусов *Drosophila* показывает, что в данном локусе в среднем обнаруживается одна точечная мутация на каждые 200 000 исследованных зародышевых клеток. У кукурузы частота мутаций в одном локусе примерно вдвое выше, т. е. 1:100 000. У человека (если считать мутации, обнаруживаемые в гетерозиготном состоянии) скорость мутирования на 1 locus равна одной мутации на 50 000—100 000 гамет. Различные локусы у одного и того же вида обладают примерно одинаковой мутабельностью. Хотя некоторые гены значительно более мутабельны, чем другие, все же можно оценить среднюю скорость возникновения спонтанных точечных мутаций на геном на поколение для дрозофилы, мыши и человека. В одном поколении *Drosophila* 1 гамета из 20 (или 1 зигота из 10) содержит новую обнаружимую точечную мутацию. У кукурузы эта частота равна примерно 1/10 гамет, тогда как у человека она равна примерно 1/5 гамет (или 2/5 зигот).

Спонтанно возникающие точечные мутации, т. е. мутации, возникающие в естественных условиях, не обнаруживают явной связи со средой ни по специфичности изменяющихся локусов, ни по типу изменения. Однако изменения среды влияют на частоту точечных мутаций. Например, в пределах температур, при которых обычно живет организм, повышение температуры на каждые 10° C приводит к 5-кратному увеличению частоты точечных мутаций. Это увеличение, хотя оно и несколько сильнее, но все же подобно изменению скоростей обычных химических реакций с повышением температуры. Очень сильные изменения температуры в любую сторону влияют еще значительно сильнее на частоту точечных мутаций. Оказывается, что почти все экстремальные условия среды увеличивают частоту точечных мутаций.

Физические и химические агенты, резко увеличивающие частоту мутаций, называются *мутагенами*. Все проникающие излучения (см. главу 13) мутагенны (см. рис. 13—3), так же как и многие высокоактивные химические вещества, в том числе горчичный газ и его производные, перекиси, эпоксиды и карбаматы. Частоты точечных мутаций, полученные при действии излучений и некоторых химических мутагенов, могут быть в 150 раз выше спонтанной частоты. Как указывалось, некоторые локусы обычно чаще мутируют, чем другие, и поэтому говорят о «спектре» спонтанных точечных мутаций. При действии ионизирующих излучений типы мутаций и затрагиваемые ими локусы не очень отличаются от тех, которые возникают при спонтанных мутациях. Таким образом, эти излучения дают *спектр мутаций*, очень похожий на спонтанный. Этого и следовало ожидать, так как энергия излучения распределяется в ядре более или менее случайным образом и усиливает, в общем, много типов химических реакций. Спектры точечных мутаций для разных химических веществ несколько различаются

друг от друга, так же как и от спонтанного спектра или спектра мутаций, индуцированных радиацией. Эти различия можно приписать отклонению от случайности при проникновении этих веществ в ядро или их способности специфически взаимодействовать с разными химическими веществами ядра. Тем не менее, частота точечных мутаций, которая растет линейно с дозой ионизирующего излучения (хотя скорость такого роста и зависит от концентрации кислорода), вероятно так же линейно растет и с дозой в ядре многих химических мутагенов. Для химических мутагенов, по-видимому, нет пороговой дозы, и число образованных данной полной дозой точечных мутаций постоянно при прочих равных условиях, независимо от скорости приложения этой дозы.

Для ультрафиолетовых лучей, которые нельзя считать излучением высокой энергии, положение иное. В этом случае вероятность индукции точечной мутации отдельным квантом значительно ниже 100%. Более того, так как при возникновении мутации может произойти взаимодействие нескольких квантов, то частота индуцированных ультрафиолетовыми лучами точечных мутаций растет с увеличением дозы быстрее, чем линейно — по крайней мере при малых дозах, причем одна и та же доза излучения при фракционированном облучении менее мутагенна, чем при однократном.

Точечные мутации не ограничиваются генами клеток какого-то одного типа, они затрагивают клетки соматических тканей всех видов как самцов, так и самок, а также диплоидные и гаплоидные половые клетки. Спонтанные точечные мутации относительно чаще возникают на поздних стадиях гаметогенеза и на самых ранних стадиях развития — на *стадиях, близких к оплодотворению*. Несмотря на весьма значительные различия в продолжительности жизни большой разницы в частотах спонтанных мутаций в половых клетках мух, мышей и человека не обнаружено. Это сходство частот мутаций неудивительно, если учесть, что большая часть этих мутаций происходит на близких к оплодотворению стадиях, так как по продолжительности таких стадий эти организмы мало различаются. Другое сходство между этими видами касается числа клеточных делений, отделяющих гаметы одного поколения и гаметы следующего поколения; эти числа у них близки. Различия между этими организмами в скорости мутирования примерно пропорциональны различиям в числе делений зародышевой клетки, приходящихся на одно поколение.

В какой момент существования гена происходит мутация? Пропорциональность частот точечных мутаций у дрозофилы, мыши и человека числу прошедших клеточных делений показывает, что некоторые из этих мутаций возникают при синтезе нового гена, хотя экспериментальные данные и не позволяют уточнить, какой именно ген подвергся мутации — старый или новый. Известно, что при старении сперматид и спермиев у дрозофилы частота точечных мутаций возрастает. Так как выживаемость этих клеток не снижается при анеуплоидии, то увеличение частоты точечных мутаций может быть вызвано действием на старый, физиологически покоящийся ген; при этом имеется в виду, что точечное мутационное изменение может произойти, когда ген связан с соседними генами хромосомы. Увеличение числа мутаций при старении клеток можно считать также результатом действия мутагена, накапливаемого со временем, который действует на старый или новый ген, как только осуществилась репликация гена. Наконец, возможно, что изменения могут происходить на стадиях, предшествующих синтезу гена, т. е. до завершения построения нового гена и присоединения его к соседям в цепи; такие изменения могут позднее быть отнесены к точечным мутациям.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ

О биологической пригодности мутантного гена — в чистом виде или в виде гибрида — лучше всего судить по его влиянию на способность организма давать жизнеспособное потомство, т. е. по его влиянию на *потенциал размножения*. Этот потенциал включает и способность особи, несущей мутацию, достигать половозрелого состояния, и ее плодовитость и фертильность в течение этого периода, а также жизнеспособность ее потомства вплоть до его полового созревания. Каждая мутация приводит к разнообразным фенотипическим эффектам; однако слабо влияющие на фенотип точечные мутации происходят гораздо чаще, чем точечные мутации с сильными фенотипическими эффектами. Например, мутации, которые в чистом виде (в гомо- или гемизиготном состоянии) снижают жизнеспособность самцов, но не летальны, встречаются по крайней мере в 3—5 раз чаще, чем рецессивно летальные (см. рис. 13—3).

Подавляющее большинство точечных мутаций снижают потенциал размножения; полезные точечные мутации крайне редки. Из истории эволюции вида следует, что в большинстве случаев мутации, влияющие на какой-либо признак или орган, приводят к его перерождению. Все генотипы вида подвергались отбору в течение многих поколений и сохранялись те из них, которые обладали наибольшим потенциалом размножения. Точечная мутация в любом определенном локусе оказывается редким событием; однако за всю историю вида многие из возможных альтернативных состояний каждого гена должны были встретиться хотя бы несколько раз. Из этих альтернативных состояний сохранились только аллели, обладающие большими преимуществами; эти-то аллели и встречаются в современных популяциях. Поэтому, когда сегодня происходит точечная мутация, то она, вероятно, приводит к одной из тех генетических альтернатив, которые уже встречались в прошлом, но были элиминированы вследствие их пониженной биологической пригодности, т. е. в результате недостаточно высокого потенциала размножения. Кроме того, следует помнить, что потенциал размножения представляет собой результат координированного действия всего генотипа. Генотип можно уподобить заводу, производящему современные автомобили, фенотип — автомобилю, а окружающую среду — источникам сырья. Имеющиеся в настоящее время генотипы, так же как и заводы, производящие автомобили, сложны и имеют длинную эволюционную предысторию. Вероятность того, что заново возникшая точечная мутация увеличит потенциал размножения, так же мала, как и вероятность того, что случайное локальное изменение на современном заводе приведет к производству лучшего автомобиля.

Различия между фенотипическим эффектом точечной мутации и ее нормальной альтернативы можно изучить, добавляя к генотипу большее количество мутантного аллеля и исследуя последствия такого вмешательства. Так, обычно дрозофила с нормальным доминантным геном bb^+ имеет длинные щетинки. У мутантной линии щетинки короче и тоньше из-за присутствия рецессивного аллеля bb (укороченные (bobbed) щетинки); этот аллель (об этом следует помнить) находится в локусе, который бывает и в X- и в Y-хромосомах. Можно было бы предполагать, что самец или самка, гомозиготные по bb , имеют укороченные щетинки из-за того, что этот аллель приводит к укорочению и истончению нормальной щетинки. Можно получить самцов XYY и самок XXU, диплоидных по остальным хромосомам и содержащих три аллеля bb ; в соответствии с тем, что высказанным предположением у этих особей щетинки должны быть еще короче и тоньше, чем у обычных гомозигот по этой мутации. Однако при наличии трех bb (утроенная доза bb) щетинки оказываются почти нормальными и по величине, и по форме (C. Stern). Этот результат показывает, что bb функционирует аналогично bb^+ , но только слабее. Мутации с дей-

ствием, п
называю
морфам,
водит к т

Больш
тип даже
ген белы

Некот
неоморф
добавлен
влияния

можно по
морфным
стью нор

его отлич
фенотипа
ная доза

одним ген
тические
дозу гено

влияние
к особям
предпочт

ту дикого
обеспечив
фенотип,
и автома

состоянии
гетерозиг
ски тот ж
наилучши

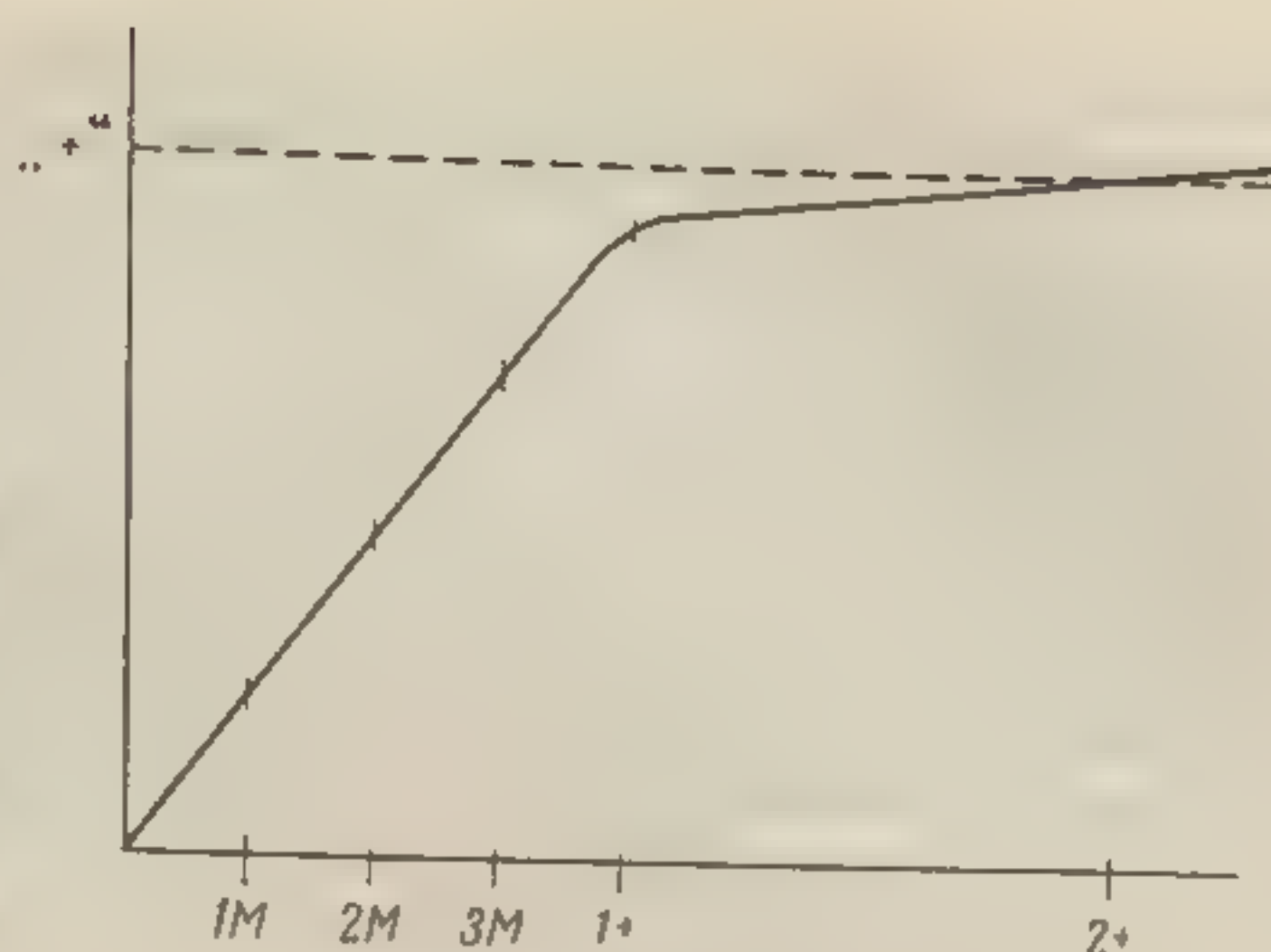
доминант
ский эфф
почему пр

ными.
Из пр
виде обы
состояни

гетерозиг
и поэтому
в гетероз
зиготном
ней мере

РИС. 14-1.

Соотношение между дозой (по оси абсцисс) и фенотипическим эффектом (по оси ординат) нормального и мутантного генов (M — мутантный, $+$ — нормальный ген) (по Н. Muller)



ствием, подобным действию нормального гена, но только более слабым, называются *гипоморфами*. Многие точечные мутации относятся к гипоморфам, так как увеличение их дозы в отсутствие нормального гена приводит к тому, что фенотип приближается к норме.

Большинство прочих точечных мутаций *аморфны* и не влияют на фенотип даже в избыточной дозе. Примером такой мутации может служить ген белых глаз (w) у дрозофилы.

Некоторые мутации, *неоморфы*, дают новый эффект, и большая доза неоморфной мутации вызывает большее отклонение от нормы, тогда как добавление большей дозы нормального гена не обнаруживает никакого влияния на фенотип. С помощью диаграммы (рис. 14—1, Н. J. Muller) можно показать связь между нормальным геном дикого типа и его гипоморфными мутантами. Отметим, что единичный ген $+$ дает почти полностью нормальный фенотипический эффект (и часто нелегко обнаружить его отличие от нормального эффекта). Два гена $+$ достигают уровня фенотипа дикого типа. Однако в случае гипоморфной мутации даже тройная доза гена не может достичь фенотипического уровня, создаваемого одним геном $+$ (вспомним эффект мутации bb). Отметим также, что генетические модификаторы или влияние среды, которые могут изменить дозу генов и потому сдвинуть фенотипический эффект, оказывают меньшее влияние при переходе от организмов с одной только дозой мутантного гена к особям с двумя генами $+$. Естественный отбор явно должен отдавать предпочтение аллелям, фенотипические эффекты которых близки к эффекту дикого типа (близки к плато кривой, рис. 14—1), так как эти аллели обеспечивают стабильность фенотипа. Любая мутация, дающая такой фенотип, будет с течением времени встречаться чаще в этой популяции и автоматически должна быть доминантной, будучи в гетерозиготном состоянии с гипоморфным вариантом гена. Эта модель показывает, почему гетерозиготы с одним геном $+$ и одним мутантным геном имеют практически тот же фенотип, что и нормальные гомозиготы; она представляется наилучшим объяснением большинства случаев полной или почти полной доминантности. Так как нормальное состояние гена уже дает фенотипический эффект, близкий к оптимальному, то эта схема показывает также, почему при прочих равных условиях так мало мутаций оказывается полезными.

Из предыдущего ясно, что гипоморфные и аморфные мутации в чистом виде обычно вредны. Каково же действие этих мутаций в гетерозиготном состоянии с нормальным геном? Если мутация аморфна, то мутантная гетерозигота может оказаться неспособной достичь фенотипа дикого типа и поэтому следует ожидать, что такие мутации будут несколько вредны в гетерозиготном состоянии. Нужно ожидать, что гипоморфы в гетерозиготном состоянии будут менее вредны или вообще не вредны, по крайней мере в отношении признака, по которому они были отнесены к гипо-

морфам. Однако каждый ген влияет на много разных биохимических процессов. Поэтому мутант, гипоморфный по одному признаку, может оказаться аморфным в отношении другого признака. Например, у дрозофилы нормальный аллель apr^+ , который обуславливает тускло-красный цвет глаз, вызывает также окраску мальпигиевых сосудов. Один из его аллелей, apr , обуславливает более слабую окраску глаз (будучи в этом отношении гипоморфным), но мальпигиевы сосуды при этом не окрашиваются (в этом отношении аллель аморфен).

Опыт подтверждает предположение, согласно которому большинство «рецессивных» летальных точечных мутаций — летальных в гомозиготном состоянии — снижают потенциал размножения, находясь в гетерозиготном состоянии. Поэтому такие мутации не полностью рецессивны; будучи у дрозофилы в гетерозиготном состоянии, они приводят к гибели примерно двух процентов особей до того, как они достигнут взрослого состояния. Обычно мутации, которые в чистом виде вредны, но не летальны, вредно действуют также и в гетерозиготном состоянии; это вредное действие несколько меньше, чем то, которое дают в гетерозиготном состоянии рецессивные летальные точечные мутации. Рассмотренные здесь принципы влияния на фенотип применимы, по-видимому, как к спонтанным, так и к индуцированным точечным мутациям.

ОБНАРУЖЕНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ У ДРОЗОФИЛЫ

Мы уже говорили о существовании генетических методов отбора точечных мутаций. Теперь мы подробно рассмотрим созданный Г. Меллером изящный метод такого отбора, использованный также и для других целей, в применении к *Drosophila melanogaster*.

Используемый обычно метод обнаружения рецессивных леталей называется «*Basc*» (см. рис. 14—2); этот метод предназначался для обнаружения мутаций, возникающих в половых клетках самцов в гемизиготных локусах X-хромосомы, т. е. в таких локусах X-хромосомы, для которых нет аллелей в хромосоме Y. Брались самцы дикого типа, нормальные по всем признакам, включая форму и окраску глаз. Самки обладали X-хромосомами, гомозиготными по гену *Bar* (*B*), изменяющего форму глаз, гену абрикосового цвета глаз (*apr*) и по двум парацентрическим инверсиям в левом плече. Меньшая инверсия (*InS*) лежит внутри большой инверсии (*In sc^{S1} sc⁸*, которая затрагивает почти все левое плечо. Левая точка разрыва большой инверсии обозначена как *sc^{S1}*, а правая — как *sc⁸*). (Название «*Basc*» произошло от *Bar*, *apr* и инверсии *scute*.) Самки (или самцы) линии *Basc* имеют полосковидные глаза типа *Bar* абрикосового цвета. Генотип самки *Basc* записывается как

$sc^{S1}B\ InS\ apr\ sc^8 / sc^{S1}B\ InS\ apr\ sc^8$.

Самцы дикого типа скрещивались с самками *Basc* и в F_1 получались дочери генотипа $+ / sc^{S1}B\ InS\ apr\ sc^8$, у которых глаза были более широкими, чем у матерей, так как они гетерозиготны по *Bar* (по всем другим признакам — они дикого типа).

Очень короткое правое плечо X-хромосомы целиком состоит из гетерохроматина; поэтому мы его здесь не рассматриваем. Каждая самка F_1 гетерозиготна по двум парацентрическим инверсиям; в связи с этим любой перекрест между левыми плечами ее X-хромосом приводит к появлению дицентрических или ацентрических кроссоверных нитей, которые не могут войти в ядро гамет (см. главу 12). Поэтому самки F_1 образуют яйцеклетки, X-хромосома которых или целиком материнская ($sc^{S1}B\ InS\ apr\ sc^8$),

или целиком отцовская (—) в отношении интересующих нас маркеров. Если эта самка F_1 скрещивается со своими братьями *Basc*, то половина сыновей в следующем поколении (F_2) получает материнскую X-хромосому +, а половина получает материнскую X-хромосому *Basc*. Поэтому, изучив потомство одной самки из F_1 , легко обнаружить наличие среди более чем 80 обычно получающихся потомков F_2 сыновей обоих типов. Заметим, что каждый сын дикого типа из F_2 содержит идентичную копию X-хромосомы, которую его мать (самка F_1) получила от своего отца (самца P_1). Даже если использованный для получения самки F_1 спермий содержит сцепленную с X-хромосомой рецессивную летальную мутацию, то самка F_1 обычно выживает, так как у нее в хромосоме *Basc* есть + аллель этой мутации. Однако у каждого из сыновей дикого типа из F_2 эта мутация находится в гемизиготном состоянии; они обычно погибают до достижения зрелого состояния, так что в F_2 не появляются сыновья дикого типа. Самка F_1 получается при оплодотворении спермием с X-хромосомой дикого типа; отсюда ясно, что отсутствие сыновей дикого типа в ее потомстве доказывает наличие в спермии P_1 рецессивной летальной мутации, сцепленной с X-хромосомой.

Такая летальная мутация должна была возникнуть в половой клетке после оплодотворения, произведенного самцом P_1 . Присутствуя она уже при оплодотворении, она не смогла бы сохраниться. Маловероятно, чтобы многие сцепленные с X-хромосомой летали, обнаруженные в спермиях, возникли на очень ранних стадиях развития, так как в этом случае такая леталь имела бы и в значительной части соматических клеток, что приводит, как правило, к гибели организма до достижения зрелого возраста. При исследовании нескольких сотен спермиев от одного самца обычно только в одном оказывается рецессивная летальная мутация, сцепленная с X-хромосомой. Следовательно, большинство сцепленных с X-хромосо-

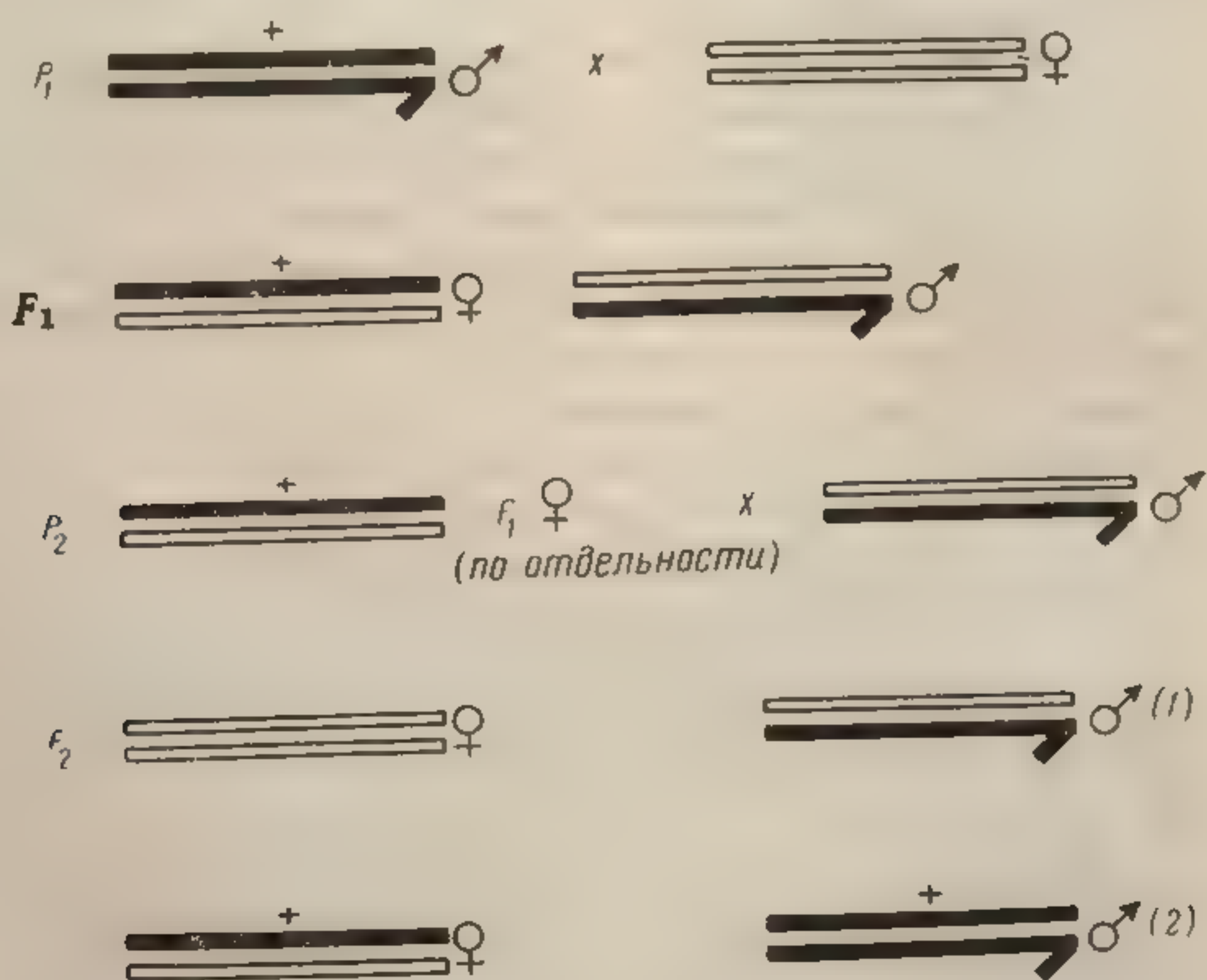


РИС. 14-2.

Схема скрещиваний, используемых в методе *Basc*.

(1) отсутствует, если рецессивная леталь содержится в хромосоме P_1 *Basc*, полученной самкой P_2 ; (2) отсутствует, если рецессивная леталь содержится в хромосоме P_1 +, полученной самкой P_2 .

мой леталей, имеющих в сперме, затрагивают лишь очень незначительную часть половых клеток. Иногда, однако, мутация происходит в половых клетках достаточно рано, так что мутации содержатся в нескольких из исследованных спермиев одного самца. Эти мутации представляют собой одну и ту же рецессивную леталь.

Если посредством тысячи отдельных скрещиваний с самками исследовать на наличие сцепленных с X-хромосомой рецессивных леталей 1000 спермиев нормальных не подвергавшихся каким-либо специальным воздействиям самцов, то окажется, что примерно два из этих скрещиваний приводят к появлению сыновей, отличных от дикого типа. Эта частота (0,2%) сцепленных с X-хромосомой рецессивных летальных мутаций довольно характерна для *D. melanogaster*. Было обнаружено, что количество спермиев, содержащих сцепленные с X-хромосомой рецессивные летали, увеличивается примерно на 3,1% при каждом увеличении дозы, которой облучается взрослый самец, на 1000 p (см. рис. 13—3, где приведены соответствующие частоты мутаций после облучения быстрыми электронами).

При таком применении метод *Basc* позволяет обнаруживать лишь те рецессивные летали, которые приводят к гибели особей до достижения ими зрелого возраста. При этом не обнаруживаются другие рецессивные летали, которые дают взрослых самцов дикого типа, но стерильных или погибающих до того, как они могут спариться. Удастся обнаружить только те рецессивные летали, которые гемизиготны у самцов F_2 . Известно, что имеется значительное число сцепленных с X-хромосомой мутаций, летальное действие которых в гемизиготном состоянии предотвращается генами, обычно имеющимися в Y-хромосоме. Эта группа не обнаруживается данным методом вследствие того, что каждый самец F_2 обычно имеет Y-хромосому. Для обнаружения Y-супрессируемых рецессивных леталей такого специального типа могут быть произведены соответствующие модификации процедуры *Basc*. Однако у метода *Basc* и в том виде, как он здесь описан, есть много преимуществ и сфер применения.

Например, удастся легко и объективно определить наличие или отсутствие самцов дикого типа среди F_2 . Так как обнаруживаемая в F_2 рецессивная леталь имеется также и у самок F_2 , гетерозиготных по *Var*, то возможно дальнейшее исследование рецессивной летали в F_2 и в последующих поколениях. Такие исследования показывают, что некоторые летали связаны с межгенными изменениями; летали, не связанные с межгенными изменениями, относят к рецессивно летальным точечным мутациям. Метод *Basc* может быть также использован для обнаружения рецессивных леталей, возникших в хромосоме *Basc* в P_1 . О наличии такой мутации свидетельствует отсутствие самцов *Basc* среди потомства F_2 . Более того, если стандартизованы внешние условия, то оказывается возможным обнаружить гемизиготные мутации, которые либо снижают жизнеспособность самцов F_2 , не будучи летальными, либо увеличивают их выживаемость сверх нормы. Этот метод позволяет также изучить влияние на жизнеспособность рецессивных леталей в гетерозиготном состоянии.

Метод *Basc* можно использовать также для обнаружения сцепленных с X-хромосомой мутаций, приводящих к видимому морфологическому изменению в гемизиготном состоянии; однако при этом пропускаются все такие «видимые» мутации, которые одновременно относятся к гемизиготным летальным. Эту трудность позволяет преодолеть метод «*Маху*» (H. J. Muller, 1954). Для этого используют самок с 15 рецессивными точечными мутациями в одной X-хромосоме и с соответствующими нормальными аллелями в гомологичной. Соответствующие парацентрические инверсии поддерживают неизменность этих хромосом в последующих поколениях. Мутанты обнаруживаются, когда у таких самок проявляются рецессивные признаки. Поэтому метод *Маху* позволяет обнаруживать любую мутацию, затра-

гивающ
что му
состоя
нантну
быть от
Иссл

показы
быть ре
мощью
Маху, н
торые и
в гемиз
женных
ному м
любая «
к некот
влияющ
на биох

ЗАКЛЮЧ

Мутацион
мера) ген
гена; ген
то генная
так и один
гена, опр
материал
так до те
Возни
клетки ил
ся лишь т
гена. Суп
представл
кое.

Мутаци
мутациям.
точечные
свойств ген

Г. ДЖ. МЕЛЛЕР
(Нью-Йорк, Колд Спринг
Харбор, 1941 г.)



гивающую нормальный аллель какого-либо из 15 рецессивов, при условии, что мутация не приводит к нормальному фенотипу в гетерозиготном состоянии с рецессивным аллелем, а также не представляет собой доминантную леталь. После того, как такие мутации обнаружены, из них могут быть отобраны точечные мутации.

Исследование рецессивных леталей в X-хромосоме и в аутосомах показывает, что имеются сотни локусов, в которых точечные мутации могут быть рецессивно летальными. Рецессивные летали, обнаруженные с помощью метода *Vasc*, и видимые мутации, обнаруженные с помощью метода *Maхu*, не следует считать взаимно исключаящими типами мутаций. Некоторые из видимых мутаций, обнаруженных методом *Maхu*, летальны в гемизиготном состоянии, а около 10% гемизиготных леталей, обнаруженных методом *Vasc*, приводят в гетерозиготном состоянии к определенному морфологическому эффекту. Можно в общем утверждать, что любая «видимая» мутация в гомо- или гемизиготном состоянии приведет к некоторому изменению выживаемости, и, наоборот, любая мутация, влияющая на выживаемость, даст эффект, «видимый», по крайней мере, на биохимическом уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутационными единицами генотипа служат (в порядке уменьшения размера) геном; хромосома; сегмент хромосомы, включающий более одного гена; ген. Так как рекомбинационный ген может иметь несколько аллелей, то генная мутация может включать как рекомбинационный ген целиком, так и один или несколько мутационных сайтов внутри него. Хотя границы гена, определенные посредством рекомбинаций и мутаций, могут не быть материально эквивалентными, мы будем по-прежнему считать, что это так до тех пор, пока не доказано обратное.

Возникновение генной мутации не ограничено плоидностью, типом клетки или гена или тем, как она влияет на синапсис. Ограниченным является лишь то влияние, которое такая мутация может оказать на полярность гена. Существование триполярных генов исключается. Биполярность представляет собой обычное состояние, а униполярность — более редкое.

Мутации, не дающие межгенных изменений, относятся к точечным мутациям. К точечным мутациям относятся и генные мутации. Поэтому точечные мутации можно использовать для выяснения мутационных свойств гена. Частота точечных мутаций линейно возрастает с увеличением

дозы проникающего излучения; на нее не влияет фракционирование дозы и для нее нет пороговой дозы, ниже которой в генетическом материале не происходило бы изменений. Точечные мутации позволяют также показать, что каждый отдельный ген относительно стабилен в течение многих клеточных генераций; изменения генов происходят в результате пространственно весьма ограниченных физико-химических событий, завершающихся в течение нескольких минут, после чего новый ген вновь оказывается устойчивым. Возникновение точечных мутаций усиливается или индуцируется изменениями температуры, старением, репликацией гена, физическими или химическими мутагенами. Возможно, что изменения, приводящие к возникновению точечной мутации, происходят в старом гене, а может быть и в новом гене, или при его образовании.

Описаны генетические схемы обнаружения сцепленных с X-хромосомой рецессивных летальных или рецессивных видимых мутаций у дрозофилы. Будучи единичным, любой из большинства нормальных генов не способен дать полностью нормальный фенотипический эффект, так что большинство точечных мутаций действуют на фенотип либо гипоморфно, либо аморфно. Изучение точечных мутаций этих и других типов показало, что почти все они снижают потенциал размножения организма, если они имеются в чистом виде (не гибриды), и в меньшей степени в гибридном состоянии. Соответственно, большинство точечных мутаций не полностью рецессивны по отношению к нормальному состоянию гена.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

14.1. Существует ли безопасная доза рентгеновых или ультрафиолетовых лучей, не вызывающая точечных мутаций? Объясните.

14.2. Можно ли утверждать, что некая определенная мутация вызывает, по-видимому, изменение одного гена, а не нескольких генов? Объясните.

14.3. Можно ли было узнать о существовании генов, если бы все гены обладали одинаковой мутационной способностью? Объясните.

14.4. Как Вы полагаете, должна ли скорость мутирования от нормы r к многопалости P быть выше у нормальных людей, среди предков которых были многопалые, чем у нормальных? Объясните. Как можно проверить Вашу гипотезу?

14.5. Накладывают ли рассмотренные мутационные свойства генов какие-либо ограничения на их химический состав? Объясните.

14.6. Когда хромосома разорвана, лежит ли точка разрыва внутри гена, между генами или возможны оба случая? Постарайтесь обосновать ответ.

14.7. Иногда точечные мутации называют генными. Как Вы полагаете, это допустимо? Почему?

14.8. Каким образом исследование мутирования зависит от изучения генов? В каком случае справедливо обратное?

14.9. Каково Ваше мнение о правомерности перенесения закономерностей возникновения точечных мутаций непосредственно на генные мутации?

14.10. Все ли мутации, обнаруживаемые с помощью методов *Basc* и *Маху*, следует считать точечными? Объясните.

14.11. Допустим, что при использовании метода *Basc* в культуре F_2 появляются оба ожидаемых типа дочерей, но совсем нет сыновей. Чему следует приписать это явление?

14.12. Как определить, связана ли рецессивная леталь, обнаруженная в F_2 по методу *Basc*, с инверсией или с реципрокной транслокацией?

14.13. Самка дикого типа дала 110 дочерей и только 51 сына. Как проверить, не вызвано ли это наличием рецессивной сцепленной с X-хромосомой летали в гетерозиготном состоянии?

14.14.
все потом
своей же н
14.15.
для опре
14.16.
Можно ли

Л И Т Е Р

P. Alexander
J. F. Crow
natural
H. J. Muller
56, 32.
Cliffs, N
H. J. Muller
печатан
tice-Hall
H. J. Muller
tions at
H. J. Muller
Biology
H. J. Muller
in Basic
A. Schalet. A
X Inter

14.14. Как можно объяснить фенотип редкой самки в линии *Maxy*, все потомство которой обычного типа, но у которой глаза несколько светлее нормы?

14.15. Сравните относительную пригодность человека и дрозофилы для определения темпа мутирования.

14.16. У самок линии *Vasc* гены в X-хромосоме сцеплены неполностью. Можно ли согласиться с таким утверждением? Почему?

ЛИТЕРАТУРА

- P. Alexander. Radiation-imitating chemicals.— *Scient. Amer.*, 1960, 202, 99.
- J. F. Crow a. R. G. Temin. Evidence for partial dominance of recessive lethal genes in natural populations of *Drosophila*.— *Amer. Naturalist*, 1964, 98, 21.
- H. J. Muller. Variation due to change in the individual gene.— *Amer. Naturalist*, 1922, 56, 32. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 104.
- H. J. Muller. Artificial transmutation of the gene.— *Science*, 1927, 66, 84—87. Перепечатано в «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 149.
- H. J. Muller. A semi-automatic breeding system («Maxy») for finding sex-linked mutations at specific «visible» loci.— *Drosophila inform. Serv.*, 1954, 28, 140.
- H. J. Muller. The nature of the genetic effects produced by radiation. In: «Radiation Biology», v. 1, A. Hollaender (Ed.), Chap. 7, p. 351. N. S., 1954.
- H. J. Muller a. I. I. Oster. Some mutational techniques in *Drosophila*. In: «Methodology in Basic Genetic», W. J. Burdette (Ed.), San Francisco, 1963, p. 249.
- A. Schalet. A study of spontaneous visible mutations in *Drosophila melanogaster*.— *Proc. X Internat. Congr. Genetics (Abstr.) Montreal*, 1958, 2, 252.

Глава 15

ГЕНОФОНД; ФАКТОРЫ РАВНОВЕСИЯ

Рекомбинационные и мутационные свойства генетического материала исследуются на перекрестно-оплодотворяющихся организмах, а природа и фенотипические проявления различных генетических единиц описываются через посредство признаков, обнаруживаемых у таких особей и их родственников. Перекрестно-оплодотворяющиеся организмы — это члены некоей общей популяции. В общей популяции у каждого организма при скрещивании есть обычно возможность выбора партнера из большого количества других членов популяции. Гаметы всех скрещивающихся особей создают пул генов, или *генофонд*, из которого выбираются гены следующего поколения. Что же происходит с частотой отдельного гена в генофонде в ряду поколений? Рассмотрим этот вопрос, сконструировав для этого некий генофонд.

Предположим, что люди заселили Марс, и прибывшее туда население достаточно велико. Допустим далее, что у этого населения из генов цвета глаз в генофонде имеются только аллель B (карие глаза) и полностью рецессивный аллель b (голубые глаза) с частотами 0,2 B и 0,8 b . Каковы должны быть генотипы и фенотипы F_1 при предположении, что фенотип цвета глаз на выбор супруга не влияет? Ответ можно увидеть из табл. 15—1. Из-за случайного соединения гамет 4% детей будут BB , 32% — Bb и 64% — bb . Фенотипически популяция F_1 состоит из 36% кареглазых и 64% голубоглазых.

Таблица 15—1

ГЕНОТИПЫ F_1 И ОБРАЗУЕМЫЙ ИМИ ГЕНОФОНД

| | | Женские гаметы | |
|----------------|---------|----------------------|------------------------|
| | | 0,2 B | 0,8 b |
| Мужские гаметы | 0,2 B | 0,04 BB (карие) | 0,16 Bb (карие) |
| | 0,8 b | 0,16 Bb (карие) | 0,64 bb (голубые) |

Популяция F_1

0,04 кареглазых (BB) + 0,32 кареглазых (Bb) + 0,64 голубоглазых (bb)

Генофонд F_1

$B = 0,04 + 0,16 = 0,2$

$b = 0,16 + 0,64 = 0,8$

Каков генофонд гамет F_1 , если нет мутаций? 4% индивидов BB из F_1 дают 4% всех гамет, и эти гаметы содержат B . 32% индивидов Bb из F_1 дают 32% всех гамет, из которых половина (16%) содержит B , а другая половина — b . Следовательно, весь генофонд содержит 20% гамет с B . Гаметы с b составляют 80% генофонда (16 от 32% гетерозигот Bb и все 64% из 64% индивидов bb). Заметьте, что генофонд F_1 идентичен генофонду P_1 . Следовательно, и в F_2 и во всех последующих поколениях будут те же

самые соотношения генотипов и фенотипов, так как частоты B и b в генофонде остаются постоянными.

Что было бы, если бы заселять Марс начал не генофонд, состоящий из 20% B и 80% b , а генофонд с каким-то другим соотношением? Можно обобщить вышеприведенный анализ, считая долю мужских и женских гамет в популяции, содержащих B , равной p , а долю гамет, содержащих b , равной q . Естественно, что как для яйцеклеток, так и для спермиев $p + q = 1$. Эти половые клетки соединяются случайным образом, давая результат, показанный в табл. 15—2. Значит, популяция потомства состоит из

$$p^2BB + 2pqBb + q^2bb.$$

Доля кареглазых равна $p^2 + 2pq$, тогда как доля голубоглазых равна q^2 . Частоты B и b в гаметах, образуемых популяцией потомства, равны:

$$B = p^2 + pq = p(p + q) = p,$$

$$b = q^2 + pq = q(q + p) = q.$$

Следовательно, частоты генов остаются такими же, как и в гаметах предыдущего поколения, и у всех будущих поколений будет тот же генофонд и те же относительные частоты диплоидных генотипов. Формула

$$p^2BB + 2pqBb + q^2bb$$

описывает генотипическое равновесие, поддерживаемое при неизменном генофонде (*правило равновесия Харди — Вайнберга*).

Таблица 15—2

ТИПЫ И ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ, ОБРАЗУЕМЫХ ГЕНОФОНДОМ, СОСТОЯЩИМ ИЗ pB И qb

| | | Яйцеклетки | |
|---------|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| | | pB (карие) | qb (голубые) |
| Спермии | pB (карие) | p^2BB (карие глаза) | $pqBb$ (карие глаза) |
| | qb (голубые) | $pqBb$ (карие глаза) | q^2bb (голубые глаза) |

Следует отметить, что это правило равновесия не зависит от наличия доминирования. Более того, B и b в формуле могут обозначать любые два аллеля, частоты которых в генофонде известны, даже если сумма их частот меньше единицы, как в случаях множественного аллелизма.

Если бы это правило равновесия было применимо без ограничений, то частоты генов должны были бы оставаться неизменными; не происходило бы эволюции различных генотипов и не возникали бы новые фенотипы. Однако для того, чтобы в описанной марсианской модели поддерживалось генное равновесие, было необходимо соблюдение некоторых условий. Одно из условий состояло в том, что не учитывалось *мутирование*, а если его допустить, то очевидно, что частота в популяции двух аллелей, B и b , изменится и равновесие нарушается. Частота любого аллеля изменится также, если различны прямая и обратная скорости мутирования этого аллеля. И в том, и в другом случае генетическое равновесие сдвигается до тех пор, пока не будет достигнуто новое равновесие. Начиная с этого момента, это новое равновесие будет сохраняться до тех пор, пока на частоту мутирования соответствующего гена не повлияет какой-либо новый фактор.

В нашей модели предполагалось также, что *потенциал размножения* (биологическая приспособленность, или адаптивная ценность) не зависит от генотипа по цвету глаз. Но при определенных условиях может быть так, что при выборе супругов отдается предпочтение людям с голубыми (или же с карими) глазами. В этом случае потенциал размножения индивида уже нельзя считать независимым от рассматриваемых аллелей. Соответственно, если люди с одной генетической конституцией дают более жизнеспособное потомство, чем люди с другим генотипом, то имеется тенденция к возрастанию в популяции частоты генов, передающих эту более высокую биологическую приспособленность, тогда как частота генов с меньшей приспособленностью стремится понизиться. Таким образом, *отбор*, воздействуя на генотипы с различной адаптивной ценностью, изменяет частоты генов и сдвигает равновесные частоты генотипов.

Мы предполагали также, что марсианская популяция велика. Допустим, однако, что населению Марса (с генофондом в $0,2 B$ и $0,8 b$) нехватает пищи и лишь одна, выбираемая по жребию, пара может иметь детей. Вероятность того, что эти супруги будут голубоглазыми, равна $0,64 \times 0,64$ или около $0,41$. Соответственно, эта величина ($0,41$) составляет вероятность того, что генофонд случайно изменится таким образом, что новые частоты генов будут равны $1,0$ для b и 0 для B . Этот *случайный генетический дрейф* можно проиллюстрировать и на примере менее экзотических ситуаций. Если популяция очень велика, но в какой-то семье в течение нескольких поколений рождается относительно большое количество детей, то доля всех людей в популяции с фамилией этой семьи ничтожна. Но если популяция уменьшается, тогда как скорость воспроизведения данной семьи не изменяется, то доля населения с фамилией этой семьи возрастет. Соответственно, если популяции очень велики, то случайные колебания в числе детей у родителей с разными генотипами несущественны и не изменяют генофонда. В небольших же популяциях такие случайные колебания могут изменить частоты генов путем случайного генетического дрейфа.

В нашей марсианской модели не рассматривалась возможность того, что в колонии могут быть эмигранты и иммигранты. Если частоты генов у эмигрантов отличны от частот в генофонде остающейся популяции, то частоты генов в остающейся популяции изменятся. Если у иммигрантов частота некоего гена отлична от его частоты у уроженцев Марса, то браки между иммигрантами и «марсианами» приведут к тому, что генофонд также изменится. Таким образом *миграция* может смещать генетическое равновесие.

Мы видим, следовательно, что свободно скрещивающаяся популяция остается неподвижной — находится в генетическом равновесии — при отсутствии мутаций, отбора, случайного генетического дрейфа и избирательной миграции. Наличие того или иного из этих факторов (или их всех вместе) изменяет частоты генов в генофонде и в результате меняет равновесные частоты генотипов. Разные виды обладают различными генофондами, и естественно предполагать, что они потому-то и различаются, что обладают разными генофондами. Поэтому факторы, изменяющие генные частоты, можно считать основными причинами образования видов. Образование более высоких таксономических категорий основывается, подобно видообразованию, на изменении генофондов. Поэтому к основным причинам биологической эволюции относятся:

- 1) мутации (которые дают исходный материал для эволюции);
- 2) отбор (который формирует из этого исходного материала биологически приспособленные генотипы рас и видов);
- 3) случайный генетический дрейф (который может дать быстрое изменение частоты гена в небольших популяциях);
- 4) избирательная миграция (которая может сдвинуть генные частоты в результате обмена особями между различными популяциями).

ОТБОР ГЕ

Уже отм
действует
обладают
место на
сохраняе
типы, а н
ных типо
случаях
ствует на
отметить,
вается от
чительно
ны плоиде
определяе
ных призи
ряющихся
обеспечив
Поэтому
явно не д
следует о
в других,

ОТБОР ПРО

Так как ч
дело с фе
«Какова с
возникнов
потенциал
мутантног
с остальны

Рассмот
в генофонд
эффектами
сивная лет

Домина
и элимини
ла. Следо
равна нул
($1,4_1$) при
годна, и ко
мутирован
быть равна
у каждой
Примером
отсутствии
качественн

Ахондро
теризуется
нормальны
ностью пер
в гетерозиг
ной вредно
детей состав
нормальным
ла коэффи

ОТБОР ГЕНОТИПОВ

Уже отмечалось, что отбор нарушает равновесие в генофонде. Отбор действует на уровне фенотипа, сохраняя в популяции те генотипы, которые обладают наибольшими репродуктивными потенциалами. Отбор имеет место на всех стадиях жизненного цикла организма. Действие отбора сохраняет целые фенотипы, а не отдельные признаки, т. е. сберегает генотипы, а не отдельные гены. Иногда отбор действует на фенотипы гаплоидных типов или стадий, сформированные отдельными геномами; в других случаях — у организмов, размножающихся половым путем, — он воздействует на смешанное фенотипическое проявление двух геномов. Следует отметить, что генотип, который на одной стадии жизненного цикла оказывается относительно приспособленным, на другой стадии может быть относительно неприспособленным, независимо от того, одинаковы или различны плоидности этих стадий. Репродуктивный потенциал организма в целом определяется, конечно, суммарной адаптивной ценностью всех этих отдельных признаков. Следует отметить, наконец, что в перекрестно-оплодотворяющихся популяциях отбор оказывает предпочтение генотипам, которые обеспечивают максимальную приспособленность популяции в целом. Поэтому некоторая часть популяции может получить генотипы, которые явно не дают организмам каких-либо преимуществ. Если это так, то следует ожидать, что те же генетические компоненты будут полезными в других, более вероятных комбинациях.

ОТБОР ПРОТИВ МУТАЦИЙ

Так как человек в основном диплоиден, то отбор преимущественно имеет дело с фенотипом, сформированным диплоидом. Для ответа на вопрос «Какова судьба мутантных генов в генофонде?» следует знать как частоты возникновения мутаций, так и характер их влияния на репродуктивный потенциал в диплоидном генотипе. Вспомним, что фенотипический эффект мутантного гена зависит не только от природы его аллеля, но и от его связи с остальным генотипом.

Рассмотрим, по очереди, как влияет отбор и мутирование на судьбу в генофонде человека мутаций со следующими полными фенотипическими эффектами: доминантная леталь; доминантная вредная мутация; рецессивная леталь; рецессивная вредная мутация.

Доминантная летальная мутация летальна в гетерозиготном состоянии и элиминируется из генофонда в том же поколении, в котором она возникла. Следовательно, биологическая приспособленность таких мутантов равна нулю. Если считать, что невыгодность нормальной гомозиготы (A_1A_1) при отборе равна нулю, то доминантная леталь совершенно невыгодна, и коэффициент отбора, s , равен единице. Легко видеть, что частота мутирования, u , для этого доминантного летального состояния должна быть равна половине частоты затронутых мутацией особей (A_1A_2), так как у каждой такой особи есть один мутантный и один нормальный ген. Примером такой доминантной летали у человека может служить, при отсутствии специального медицинского лечения, *ретинобластома* (злокачественная опухоль сетчатки).

Ахондропластическая (или *хондродистрофическая*) карликовость характеризуется непропорциональностью частей тела — голова и туловище нормальных размеров, тогда как руки и ноги укорочены. Это редкое, полностью пенетрантное (см. стр. 88) заболевание вызвано присутствием в гетерозиготном состоянии гена, который действует в качестве доминантной вредной мутации; известно, что у таких карликов (A_1A_2) количество детей составляет лишь 20%, по сравнению с количеством детей, рождаемых нормальными людьми. Из-за такого снижения репродуктивного потенциала коэффициент отбора генотипа A_1A_2 равен 0,8.

В одном исследовании частоты A_1A_2 в популяции было обнаружено, что 10 детей-карликов приходится на 94 075 рождений. В этом случае дети-карлики могли рождаться как от нормальных родителей, у которых были вновь возникшие мутации A_2 , так и от нормального и карликового родителя. Поэтому частота в популяции гена A_2 , p , должна быть $10/2 \times 94\,075$, или 0,000053. Из тех случаев, для которых известно, что у карликов были нормальные родители, частота мутирования, u , в A_2 равна 0,000042. Если правильно, что $s = 0,8$, то $p = u/s = 0,000042/0,8 = 0,0000525$, что прекрасно соответствует наблюдаемой частоте гена (p). Для доминантной летали частота гена равна частоте мутирования ($p = u$), так как $s = 1$; однако в данном случае s меньше единицы, так что частота гена больше частоты мутирования. В настоящее время частота гена карликовости не намного выше частоты мутирования, что свидетельствует об эффективности элиминирования таких мутаций из генофонда с помощью естественного отбора.

Ген юношеской формы амавротической семейной идиотии (a_2) не дает видимого эффекта в гетерозиготном состоянии (A_1a_2); гомозиготные дети погибают; следовательно a_2 — это рецессивная летальная мутация. Один человек с такой мутацией обнаруживается на 100 000 человек, или с частотой 0,00001. Какова частота a_2 в генофонде? Как показано в табл. 15—3,

Таблица 15—3

ЮНОШЕСКАЯ АМАВРОТИЧЕСКАЯ СЕМЕЙНАЯ ИДИОТИЯ. (ОБЪЯСНЕНИЯ В ТЕКСТЕ)

| Генотип | A_1A_1 | A_1a_2 | a_2a_2 |
|------------------------|------------|------------|----------|
| Фенотип | нормальный | нормальный | погибает |
| Частота при равновесии | p^2 | $2pq$ | q^2 |

u = частоте мутирования из A_1 в a_2
 $q = \sqrt{u/S}$, где $S = 1$, следовательно $q = \sqrt{u}$
 $u = 10^{-5} = 0,00001$, следовательно $q = \sqrt{0,00001} = 0,003$

| Действительная частота при равновесии | (p^2) | $(2pq)$ | (q^2) |
|---------------------------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | $(0,997)^2$ | $2(0,997)(0,003)$ | $(0,003)^2$ |
| | 0,994 | 0,006 | 0,00001 |

частота особей a_2a_2 при равновесии равна q^2 . Соответственно, частота a_2 (q) должна быть равна $\sqrt{q^2}$ или 0,00001, т. е. около 0,003, тогда как частота A_1 должна быть равна $1,0 - 0,003 = 0,997$. Заметим, что гетерозиготы (носители) встречаются в 600 раз чаще больных-гомозигот. Какова частота мутирования A_1 в a_2 ? Допустим, что генофонд находится в равновесии; другими словами, частота, с которой a_2 поступают в популяцию за счет мутирования, равна частоте, с которой они исчезают из популяции с гибелью гомозигот a_2a_2 . Тогда скорость мутирования в a_2 должна быть равна 0,00001. Коэффициент отбора для здорового человека (A_1A_1 и A_1a_2) равен 0, тогда как для a_2a_2 он равен 1. Таким образом, частота рецессивной мутации в генофонде может быть выражена как $q = \sqrt{u/s}$, где $s = 1$ для рецессивных леталей. Если рецессивная мутация в гомозиготном состоянии вредна, но не летальна, то s меньше единицы (но больше нуля) и частота мутантного гена в генофонде возрастает. Так, если бы s было равно $1/4$, а не 1, то q увеличивалось бы вдвое.

НЕСЛУЧАЙНЫЕ СКРЕЩИВАНИЯ

Определяя типы и частоты генотипов в популяции при равновесии, мы допускали, что браки заключаются случайно по отношению к рассматриваемым признакам, которые контролируются генотипом. Такая случайно, свободно скрещивающаяся популяция называется панмиктической, она

претерпевает *панмиксис*. Что произойдет, если браки между различными генотипами будут неслучайными? Обратимся к болезни *фенилкетонурии* (рис. 15—1), при которой люди, гомозиготные по рецессивному гену, страдают одним из видов слабоумия; кроме того, в их организме одна из аминокислот, фенилаланин, превращается в токсичную фенилпировиноградную кислоту. Частота нормального гена (A) в генофонде равна 0,99, а частота ненормального гена a — 0,01. Поэтому в равновесной популяции частоты индивидов $AA : Aa : aa$ равны, соответственно, 9801/10 000 : 198 /10 000 : 1/10 000. Заметьте, что индивиды Aa встречаются в 198 раз чаще, чем aa , так что даже если ни один из aa не даст потомства, то в каждом поколении из генофонда исчезнет лишь 1% имеющихся в нем генов a . Отсюда видна неэффективность отбора против гомозигот для редких рецессивных генов, по крайней мере в отношении понижения частоты таких генов. Очевидно, что индивидуумы AA и Aa вступают в брак случайным образом, но это не относится к людям, страдающим слабоумием; в отношении этого последнего признака не происходит панмиксиса, и люди с различными генотипами имеют тенденцию быть ограниченными в своих браках — все доступные партнеры образуют для этого индивида *репродуктивный изолят*. Существование разных репродуктивных изолятов для нормальных людей и для людей, больных фенилкетонурией, мало влияет на относительные частоты различных генотипов в ряду поколений, так как лишь небольшая часть всех имеющихся в популяции генов a приходится на долю людей aa . Ясно, что имеют значение только браки двух индивидов Aa , так как в результате таких браков и появляется большая часть потомства aa .

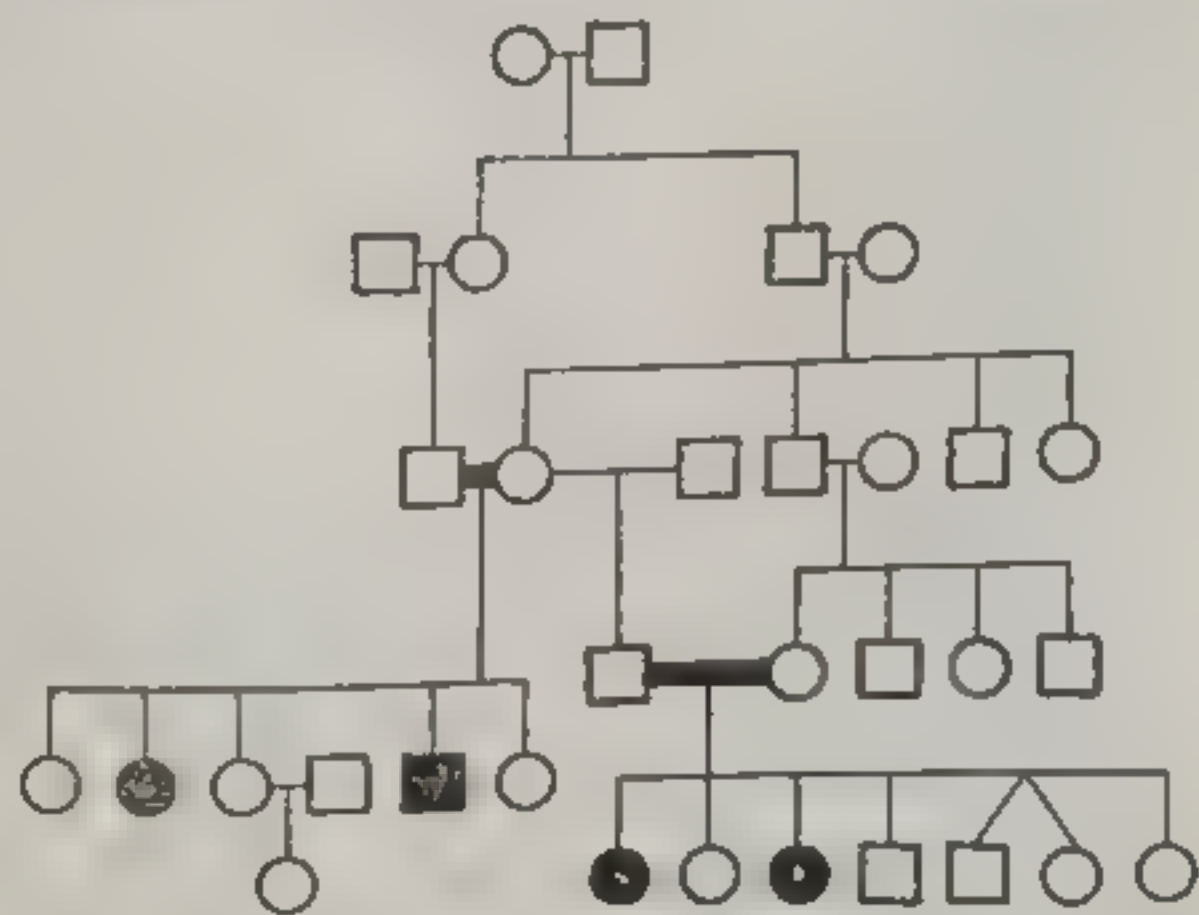
На примере фенилкетонурии видно, что когда ген полностью рецессивен и встречается редко, нарушение случайности браков мало влияет на частоту гена и на диплоидные генотипы (гетерозиготные или гомозиготные), в которых он имеется в популяции. Однако очевидно, что если мугация встречается в популяции относительно часто, то неслучайные браки повышают частоты одних диплоидных генотипов и понижают частоты других. Более того, если между разными генотипами существуют различия в приспособляемости, то состав генофонда может измениться в другом направлении или к другой частоте, чем предсказываемые для свободно скрещивающейся популяции.

Рассмотрим два пути возможного нарушения случайности скрещивания. Первый заключается в тенденции к спариванию фенотипически сходных индивидов (за исключением пола), названному *ассортативным скрещиванием*. Этот тип размножения вообще соответствует норме у животных, включая человека. Генетическим результатом здесь оказывается получение большего количества гомозигот, чем должно было бы быть при свободном скрещивании.

Другое отклонение от случайного скрещивания включает родственное спаривание, *инбридинг*, т. е. тенденцию спаривающихся быть связанными по происхождению ближе, чем при случайном выборе партнера. Каково

РИС. 15-1.

Родословная, показывающая появление фенилкетонурии у потомков браков между кузенами (эти браки выделены жирной линией)



действие инбридинга, проведенного в одном поколении? Это можно определить, проследив судьбу генов, которые в родительском поколении были гетерозиготными. Существуют различные степени инбридинга: форма наиболее близкого инбридинга — это *самооплодотворение*, при самооплодотворении гетерозигота по данной паре генов Aa дает потомство, половина которого гомозиготна. В общем, уменьшение гетерозиготности из-за самооплодотворения может быть выражено так: вероятность того, что некий потомок получит данный ген в мужской гамете, равна $1/2$; поэтому вероятность того, что потомок гомозиготен по этому аллелю, равна $1/4$. Однако существует равная вероятность того, что потомок станет гомозиготным по другому аллелю, так что полная вероятность гомозиготности при таком типе инбридинга равна 50%. Если все особи популяции гетерозиготны и происходит самооплодотворение, то в каждом последующем поколении половина генов, пребывавших ранее в гетерозиготном состоянии, переходит в гомозиготное состояние.

Допустим, с другой стороны, что в свободно скрещивающейся части популяции содержится $X\%$ гомозиготных особей. Эти особи могли появиться в результате скрещивания двух гетерозигот, или двух гомозигот, или же гетерозиготы и гомозиготы. Если генофонд находится в равновесии, то случайные скрещивания, стремящиеся увеличить количество гомозигот, уравниваются другими, снижающими их число, так что из поколения в поколение сохраняются те же $X\%$ гомозигот. Посмотрим, что же произойдет в другой части этой же популяции, где в течение одной генерации происходит самооплодотворение. Так как в этой части популяции уже было $X\%$ гомозигот, то и в потомстве будет тоже $X\%$ гомозигот. Но если эта часть гетерозиготна на $Z\%$, то в потомстве после самооплодотворения будет только $1/2 Z\%$ гетерозигот и, следовательно, всего гомозигот будет $X\% + 1/2 Z\%$. Иными словами, при самооплодотворении каждая генерация переводит половину всех гетерозиготных генов в гомозиготное состояние, а в обычной свободно скрещивающейся популяции самооплодотворение приводит к увеличению частоты гомозиготности при свободном скрещивании на $1/2$ частоты гетерозиготности.

Насколько увеличивается гомозиготность при браках *брат — сестра* (*сисбсы*)? Вероятность того, что некий определенный ген отца имеется у его сына, равна $1/2$, а вероятность того, что внук получит этот ген, также равна $1/2$; вероятность того, что произойдут оба эти события, равна $1/4$. Вероятность того, что дочь получит и передаст этот же ген своему ребенку, также равна $1/4$. Следовательно, вероятность того, что ребенок от такого брака получит два одинаковых аллеля, равна произведению $1/4 \times 1/4$; вероятность гомозиготного состояния этого гена равна $1/16$. Так как ребенок имеет равную вероятность стать гомозиготным по другому аллелю своего дедушки, а также по каждому из двух аллелей своей бабушки, то вероятность его гомозиготности равна $4 \times 1/16$, или 25%. Иными словами, браки брат — сестра приводят к тому, что $1/4$ гетерозиготных генов становятся гомозиготными. Эта вероятность гомозиготности в результате браков брат — сестра добавляется к вероятности гомозиготности, возникающей в результате свободных браков.

Браки между особями, у которых общим является один родитель, называются *браками полусисбсов*. В этом случае вероятность, с которой данный аллель общего родителя переходит к сыну, равна $1/2$, а вероятность, с которой его потомство получает этот аллель, также равна $1/2$; поэтому вероятность того, что происходят оба этих события, равна $1/4$. $1/4$ равна также и вероятность того, что эти события происходят с дочерью, поэтому вероятность того, что данный аллель становится гомозиготным при браке полусисбсов, равна $1/4 \times 1/4 = 1/16$. Так как таким же путем с вероятностью $1/16$ может становиться гомозиготным и другой аллель общего родителя, то полная добавочная вероятность гомозиготности при браках

между
такого
сте
коэфф
лить,
 $1/16$. С
родосл
Ве
тать в
рии.
10 000
ность
должны
свобод
кузено
(шесть
ветстве
браках

Друг
аномали
Японии
ском во
чем при
ях таки
ном сост
которой
вредной
может п
что инбр
динга мн
ко же ос
ным алл
вает, что
выгодна.

ГЕТЕРОЗ

Однако у
водит к
с гомози
восходит
ридной ст
генотипо

между полусибсами равна $1/8$; иными словами, в результате инбридинга такого типа $1/8$ гетерозиготных генов становятся гомозиготными.

Степень уменьшения гетерозиготности из-за инбридинга называется *коэффициентом инбридинга*, F . Аналогичным образом мы можем определить, что в случае брака двоюродных брата и сестры (кузенов) F равно $1/16$. Соответственно могут быть получены величины F для более сложных родословных.

Все типы инбридинга повышают гомозиготность. Попробуем рассчитать влияние брака двоюродных брата и сестры на частоту фенилкетонурии. Частота этого гена в гетерозиготном состоянии составляет 198 на 10 000 человек (см. стр. 219). Браки кузенов уменьшают гетерозиготность на $1/16$, или на двенадцать индивидуумов, из которых половина должны быть нормальными (AA), а половина больными (aa). Так как при свободных скрещиваниях рождается один больной на 10 000, то браки кузенов повышают полное число больных гомозигот в популяции до семи (шесть в результате инбридинга и один от неродственного брака). Соответственно вероятность рождения детей, больных фенилкетонурией, при браках кузенов в семь раз выше, чем при неродственных браках.

Таблица 15—4

УВЕЛИЧЕНИЕ РИСКА ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ
ПРИ БРАКАХ КУЗЕНОВ
(данные из Хиросимы и Нагасаки)

| | Частота при не- родствен- ных роди- телях | Увеличение частоты при браках между кузенами | Процент увеличения |
|------------------------|---|---|-----------------------|
| Врожденные уродства | 0,011 | 0,005 | 48 |
| Рождение мертвых детей | 0,025 | 0,006 | 24 |
| Гибель в детстве . . . | 0,023 | 0,008 | 34 |

Другой пример того, как браки кузенов увеличивают риск появления аномалий, вытекает из исследования, которое показало, что среди населения Японии (табл. 15—4) врожденные уродства, мертворождения и смерти в детском возрасте в случае браков кузенов наблюдаются на 24—48% чаще, чем при неродственных браках. Так как известно, что в некоторых случаях такие же дефекты обусловлены рецессивными генами в гомозиготном состоянии, то эти результаты подтверждают точку зрения, согласно которой получающаяся при инбридинге гомозиготность может оказаться вредной. Итак, инбридинг увеличивает гомозиготность, а гомозиготность может привести к появлению дефектов; однако не следует делать вывод, что инбридинг невыгоден при любых обстоятельствах. В результате инбридинга многие особи становятся гомозиготными по вредным генам, но столько же особей становятся гомозиготными и по соответствующим нормальным аллелям. Жизнеспособность самооплодотворяющихся видов показывает, что по крайней мере для некоторых типов организмов гомозиготность выгодна.

ГЕТЕРОЗИС

Однако у видов, обычно перекрестно-оплодотворяющихся, инбридинг приводит к снижению жизнеспособности, которое непосредственно связано с гомозиготностью. Какова же функциональная основа адаптивного пре-восходства гетерозигот, которое обычно называют *гетерозисом*, или *гибридной силой*? Рассмотрим фенотипические эффекты трех альтернативных генотипов AA , AA' и $A'A'$, пусть жизнеспособность $A'A'$ ниже, чем AA .



РИС. 15-2.

Вариабельность початков нормальной кукурузы, на которые указывает Джеймс Ф. Кроу (1959 г.)

Независимо от того, доминирует ли A полностью или частично над A' , или же не доминирует, гетерозигота AA' должна превосходить одну из гомозигот. Возможно также, что гетерозигота обладает более высокой приспособляемостью, чем гомозигота любого типа. Чтобы проиллюстрировать такую возможность, представим себе, что A плеiotропно, обладая относительно высоким приспособительным эффектом в отношении признака X и относительно низким адаптивным эффектом в отношении признака Y , тогда как для A' справедливо обратное: относительно низкая приспособляемость для X и относительно высокая для Y . При отсутствии доминирования гетерозигота превосходит любую из гомозигот. Поэтому может быть достигнут гетерозис, когда гетерозигота превосходит либо обе, либо только одну из гомозигот.

Гетерозисный эффект первого типа можно продемонстрировать, скрещивая две чистые линии, гомозиготные по различным вредным рецессивам ($AAbbCCdd \times aabbCCDD$). Все поколение $F_1(AabbCCDd)$, обладающее нормальными аллелями в трех локусах, сильнее, чем любой из родителей (у каждого из которых имеются нормальные аллели в двух локусах), так как доминантные аллели скрадывают вредные эффекты рецессивных. В этом случае гетерозиготное потомство F_2 , несущее $AabbCCDd$, приспособлено не более, чем гомозиготы $AAbbCCDD$.

Гетерозисный эффект второго типа можно показать на примере человека. Как уже отмечалось на стр. 78, гомозиготы по гену *серповидноклеточной анемии* ($\beta^S\beta^S$) обычно погибают от анемии еще в детстве. Люди $\beta^A\beta^A$ имеют нормальную кровь, тогда как у людей $\beta^A\beta^S$ кровь может быть либо нормальной, либо у них может быть слабо выраженная анемия. В некоторых странах частота β^S в генофонде соответствует частоте, ожидаемой

для ре
горазд
более
Конечн
ства, т
ности в
видов
анемия
соответ
В с
быть с
лярип,
приспо
 $\beta^A\beta^S$ м
15 п. ге

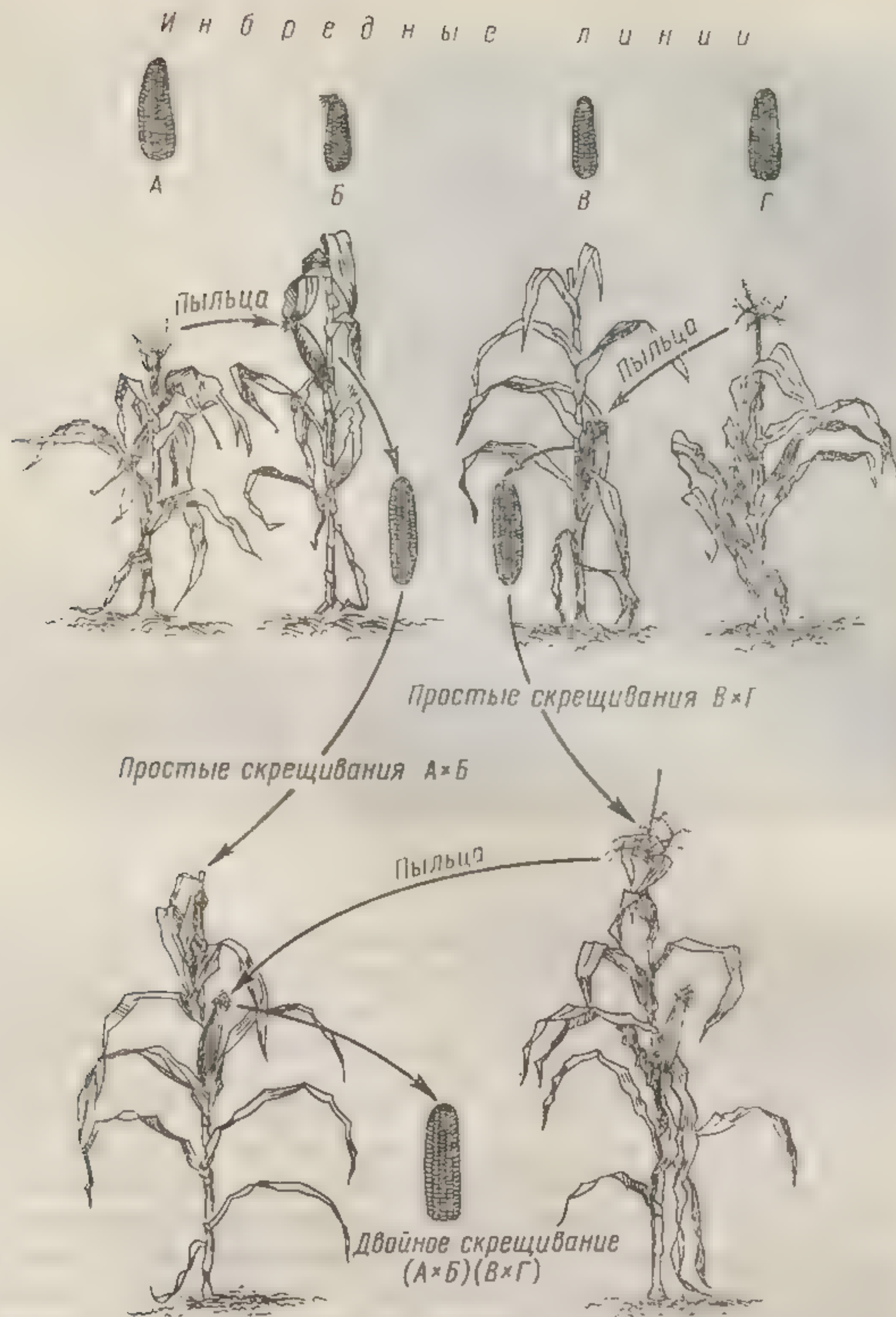


РИС. 15-3.

Получение коммерческой гибридной кукурузы методом «двойного скрещивания»

для рецессивно летального гена. Однако в других странах β^S встречается гораздо чаще. Это различие приписывается тому, что гетерозигота $\beta^A\beta^S$ более устойчива к некоторым формам малярии, чем гомозигота $\beta^A\beta^A$. Конечно, в странах, где нет малярии, у β^S нет антималярийного преимущества, так что приспособленность гетерозиготы ($1-s$) ниже приспособленности нормальной гомозиготы (1), в то время как приспособленность индивидов $\beta^S\beta^S$ равна нулю. Поэтому, как и ожидается, серповидноклеточная анемия редка или вообще не встречается в большинстве стран, где нет соответствующих форм малярии.

В странах же с высокой частотой малярии, хотя гетерозиготы и могут быть слегка анемичными, такое преимущество, как устойчивость к малярии, обеспечивает им более высокую общую приспособленность, чем приспособленность генотипа $\beta^A\beta^A$. Здесь приспособленность гетерозиготы $\beta^A\beta^S$ максимальна и поэтому ей нужно приписать значение 1,0, тогда



ФЕОДОСИЙ
ДОВЖАНСКИЙ
(1957 г.)

как приспособленность нормального генотипа, $\beta^A\beta^A$, равна $1 - s_1$. Приспособленность мутантной гомозиготы $\beta^S\beta^S$ равна $1 - s_2$, где $s_2 = 1$, так как все $\beta^S\beta^S$ погибают (даже если они и крайне невосприимчивы к малярии). В данном случае естественный отбор сохраняет в генофонде и β^A , и β^S , поддерживая частоту β^S на уровне $\frac{s_1}{s_1 + s_2}$ («преимущество β^S , проявляющееся как преимущество $\beta^A\beta^S$ над $\beta^A\beta^A$, деленное на суммарную вредность β^A и β^S). Таким образом, когда гетерозигота, будучи более приспособленной, чем любая из гомозигот, проявляет гетерозис, то естественный отбор сохраняет в генофонде такой ген, как β^S , несмотря на его летальность в гомозиготном состоянии.

Мы рассматривали гетерозис через фенотипические эффекты членов аллельной пары. Однако не следует думать, что всегда единицей гетерозисного действия оказывается отдельная пара генов. Известно, что при формировании фенотипов различными путями взаимодействуют разные пары генов, и поэтому не следует удивляться, если обнаружится, что гетерозис возникает в результате действия комбинаций аллелей и неаллелей.

В природных популяциях *Drosophila pseudoobscura* встречаются различные парацентрические инверсии. Лабораторные популяции можно вывести из особей с нормальной структурой хромосом и из особей с какой-либо одной из этих инверсий. В некоторых случаях после нескольких генераций в популяции оказываются только нормальные хромосомы, так как хромосома с инверсией ведет себя как вредный ген, который не обеспечивает преимущества, находясь в гетерозиготном состоянии, и элиминируется из генофонда. Однако, когда таким образом испытывали некоторые другие инверсии, то достигалось равновесие — в генофонде сохранялись как нормальные хромосомы, так и хромосомы с инверсией. В этих случаях гетерозигота по инверсии адаптивно превосходит любую из гомозигот, давая гетерозис, так же как и ген серповидноклеточности в странах с широким распространением малярии. Однако в таких случаях трудно определить генетическую основу гетерозиса, так как гибридная сила может быть обусловлена или генами, приобретенными или утраченными при возникновении инверсии, или новым расположением инвертирован-

ных ге
инверс
сиями
стим, ч
ствует
ловлен
ложени
констит
невозмо
участка
Мето
в отнош
Наприм
чем на
кукуруз
(рис. 15)
инбрид
желател
нии инб
и облада
готны п
разных
розигот
любая и
Итак,
ном случ
лись из э
ные семе
табельно
отобранн
гибрида
скрещива
мощном

СЮЭЛ РАЙТ
(1954 г.),

известный исследователь
в области физиологиче-
ской генетики и матема-
тических проблем гене-
тики популяций



ных генов, или же типами генов или группы генов, находящихся в области инверсии. Вспомним, что у дрозофилы особи с парацентрическими инверсиями не находятся в невыгодном положении при воспроизведении и допустим, что у особей, гетерозиготных по парацентрической инверсии, существует или возникает некая гетерозисная система. Если гетерозис обусловлен действием нескольких специфических неаллельных генов, расположенных в области инверсии, то такая адаптивно благоприятная генная конституция имеет тенденцию остаться в гетерозиготе интактной из-за невозможности для единичных кроссоверов внутри инвертированного участка войти в гаплоидное ядро яйцеклетки.

Методы разведения, создающие гибридную силу, широко используются в отношении растений и животных, играющих важную роль в экономике. Например, использование гибридной кукурузы обогатило общество более чем на миллиард долларов. Вы можете спросить: чем плоха обычная кукуруза?— Она слишком непостоянна по качеству и жизнеспособности (рис. 15—2). Инбридинг уменьшает это непостоянство, но к несчастью инбридинг приводит также и к утрате жизнеспособности или других желательных качеств. Путь к решению этой проблемы состоит в получении инбредных линий, которые однородны, будучи гомозиготными, и обладают разными желательными доминантными генами (а также гомозиготны по разным нежелательным рецессивным генам), и в скрещивании разных инбредных линий друг с другом. Их F_1 будет множественно-гетерозиготным, однородным и обладать большей жизнеспособностью, чем любая из родительских инбредных линий.

Итак, получают гибриды двух отобранных инбредных линий — в данном случае кукурузы. Хотя растения F_1 сильны и однородны, они получились из зерен одной из менее мощных инбредных линий. Поэтому гибридные семена не очень многочисленны; следовательно, их получение нерентабельно. В практике эту трудность обходят (рис. 15—3), скрещивая четыре отобранных инбредных линии «две на две» и получая два различных гибрида от одиночного скрещивания. Затем два гибрида от одиночных скрещиваний скрещиваются друг с другом. Будучи образованными на мощном гибридном растении, полученном при одиночном скрещива-

нии, семена, полученные при таком *двойном скрещивании*, обильны и их можно продавать по недорогой цене. Гетерозис имеет огромное практическое значение; для более глубокого понимания этого явления необходимы исследования на биохимическом, молекулярном уровне (И. В. Саркисян, М. А. Кессингер и В. Харрис, 1964).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гаметы, функция которых состоит в том, чтобы давать следующее поколение перекрестно-оплодотворяющейся популяции, заключают в себе некий генофонд. Генофонд и относительные частоты генотипов в ряду поколений остаются неизменными, если: 1) величина популяции (генофонда) столь велика, что генетический дрейф невозможен; 2) нет избирательного мутирования в каком-нибудь направлении; 3) не происходит дифференцированного отбора генотипов; 4) мигранты генотипически идентичны местным особям. Если же не выполняется хоть одно из этих условий, то происходит сдвиг в составе генофонда; иными словами, частоты генов, и, следовательно, частоты различных генотипов будут изменяться до тех пор, пока не будет достигнуто новое равновесие.

Предполагается, что не только образование видов, но и вся биологическая эволюция основана на изменениях генофонда.

Обсуждается роль мутирования и отбора в установлении генетического равновесия для тех редких мутаций, которые снижают репродуктивную приспособленность, будучи доминантными летальными, или доминантными вредными мутациями, рецессивными летальными, или рецессивными вредными мутациями.

Неслучайные скрещивания, возникающие вследствие ассортативного скрещивания или инбридинга, увеличивают частоту гомозигот. Скорость уменьшения гетерозиготности на поколение в результате инбридинга составляет $\frac{1}{2}$ при самооплодотворении, $\frac{1}{4}$ при скрещиваниях сибсов, $\frac{1}{8}$ при скрещиваниях полусибсов и $\frac{1}{16}$ при скрещиваниях кузенов. Гомозиготность у обычно перекрестно-оплодотворяемых организмов приводит к снижению жизнеспособности, тогда как гетерозиготность сопровождается гетерозисом.

Гетерозис, который возникает как фенотипический результат взаимодействия генов, имеет огромное экономическое значение, вследствие того, что гетерозиготы адаптивно лучше одного или даже обоих типов гомозигот.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

15.1.⁵ Одинаковы ли причины эволюции в популяциях с бесполым размножением и в популяциях, размножающихся половым путем? Объясните.

15.2. Допустим, что в популяции, подчиняющейся закону Харди — Вейнберга, только в одном поколении происходит мутирование и изменяется состав генофонда. Сколько еще пройдет генераций, пока установится новое генетическое равновесие? Объясните.

15.3. Обсудите утверждение: «Закон Харди — Вейнберга — это краеугольный камень эволюционной генетики».

15.4. Какова частота гена R (при условии применимости принципа Харди — Вейнберга), если его единственный аллель R' гомозиготен в таком проценте от всей популяции: 49%? 4%? 25%? 36%?

15.5. В США около 70% населения ощущает горький вкус фенилтиокарбамида (ФТК). Эти люди названы «ощущающими», а остальные 30%, которые не чувствуют горького вкуса ФТК, названы «неощущающими».

ми». Все б
Все эксп
и «неощущ
генов; меж
имеется п
а) Какой
б) Какая
не может
ФТК?
в) Какая
Двумя «о
15.6. Д
ляции рав
по A , если
ными поте
15.7. Ч
няется пра
поколений
15.8. М
няться для
15.9. С
в популяци
а) доминан
б) рецесси
в) фенотип
организма;
г) встречае
д) присутст
15.10. М
а) гаплоиде
б) самцов
в) двух ди
случае дайт
15.11. Ч
коэффициен
что все ост
рецессивна
15.12. Е
ветствующи
способность к
в генофонд
15.13. С
взаимно ис
вания (пан
15.14. О
инбридинга
15.15. П
Харди — В
0,3 и 0,7.
а) Какой п
генам?
б) Каков до
которой гиб
в) Как усло
15.16. Об
ков между

ми». Все браки между «неощущающими» дают в потомстве «неощущающих». Все эксперименты подтверждают, что различие между «ощущающими» и «неощущающими» определяется отдельной парой несцепленных с полом генов; между этими двумя типами аллелей имеется полная доминантность; имеется полная пенетрантность доминантного аллеля.

а) Какой из двух аллелей доминантен?

б) Какая часть всех браков между «ощущающими» и «неощущающими» не может дать (за исключением мутаций) детей, «неощущающих» горечи ФТК?

в) Какая часть всех браков заключена между двумя «неощущающими»? Двумя «ощущающими»?

15.6. Доля особей АА в большой перекрестно-скрещивающейся популяции равна 0,09. Какая часть популяции должна быть гетерозиготна по А, если принять, что все генотипы обладают одинаковыми репродуктивными потенциалами относительно этого локуса?

15.7. Что должно произойти с популяцией, генофонд которой подчиняется правилу Харди — Вейнберга в течение очень большого количества поколений? Почему?

15.8. Может ли в некоей популяции закон Харди — Вейнберга выполняться для одной пары генов и не выполняться для другой? Объясните.

15.9. Объясните, существенно ли влияет на сдвиг частоты аллеля в популяции частота мутирования по этому аллелю, если этот ген:

а) доминантная леталь, приводящая к гибели на ранних стадиях развития;

б) рецессивная леталь;

в) фенотипически проявляется только после репродуктивного периода организма;

г) встречается очень редко;

д) присутствует в небольших перекрестно-оплодотворяющихся популяциях.

15.10. Может ли адаптивная ценность этого же гена (15.9) быть равной у:

а) гаплоидов и диплоидов?

б) самцов и самок?

в) двух диплоидных клеток одного и того же организма? В каждом случае дайте обоснованный ответ.

15.11. Что случится с частотой в генофонде доминантной мутации, коэффициент отбора которой изменился от единицы до $1/4$ при условии, что все остальные особенности не меняются? Если мутация полностью рецессивна?

15.12. Если человек с вредными мутациями не вступает в брак, то соответствующие гены исчезают из генофонда. При каких условиях неспособность к браку может существенно снижать частоту вредных мутаций в генофонде?

15.13. Следует ли считать инбридинг и ассортативное скрещивание взаимно исключаящими друг друга отклонениями от свободного скрещивания (панмиксиса)? Объясните.

15.14. Объясните, почему для скрещивания кузенов коэффициент инбридинга, F , равен $1/16$.

15.15. Пусть в свободно скрещивающейся и подчиняющейся правилу Харди — Вейнберга популяции частоты А и а равны, соответственно, 0,3 и 0,7.

а) Какой процент в такой популяции составляют гомозиготы по этим генам?

б) Каков должен быть ответ на вопрос (а) после одной генерации, в течение которой гибриды скрещиваются только с гибридами?

в) Как условия вопроса (б) должны влиять на состав генофонда?

15.16. Обсудите с генетической точки зрения пользу и вредность браков между кузенами у человека.

15.17. Среди населения Таиланда гетерозиготы по мутантному гену, который приводит к образованию гемоглобина Е, более распространены, чем этого следует ожидать, исходя из правила Харди — Вейнберга. Как это можно объяснить?

15.18. В двух инбредных линиях кукурузы и у их F_1 гибридов исследованы локомоторная активность для каждого растения в каждой группе в течение трех следующих друг за другом 5-минутных интервалов и потребление кислорода. В обоих отношениях гибриды F_1 более однородны, чем родительские линии. Предложите генетическую гипотезу, объясняющую эти результаты.

15.19. Сравните репродуктивные изоляты людей, которые вступали в брак в 1900 г., с изолятами вступающих в брак в наше время. Какие факторы остались теми же и какие изменились? Желательно ли это изменение с биологической точки зрения? Дайте обоснование Вашего ответа.

ЛИТЕРАТУРА

- A. C. Allison. Sickle Cells and Evolution. — *Scient. Amer.*, 1956, 195, 87.
J. F. Crow. Genetics Notes. 5th ed. Minneapolis, Burgess, 1962.
Th. Dobzhansky. Genetics and the Origin of Species, 3rd ed. N. Y., 1951.
Th. Dobzhansky. Evolution, Genetics and Man. N. Y., 1955.
J. W. Gowen. (Ed.). Heterosis. Ames. Iowa, 1952.
G. H. Hardy. Mendelian Proportions in a Mixed Population. — *Science*, 1908, 28, 49.
Reprint in «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, N. Y., Prentice-Hall, 1959, p. 60 and in «Great Experiments in Biology», M. L. Gabriela. S. Fogel (Eds), Englewood Cliffs, N. Y., Prentice-Hall, 1955, p. 295.
C. C. Li. Human Genetics. N. Y., 1961.
M. Rasmuson. Genetics on the Population Level. Stockholm — London, 1961.
E. B. Spiess. (Ed.). Papers on Animal Population Genetics. Boston, 1962.
I. V. Sarkissian, M. A. Kessinger a. W. Harris. Differential Rates of Development of Heterotic and Nonheterotic Young Maize Seedlings. I. Correlation of Differential Morphological Development with Physiological Differences in Germinating Seeds. — *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S.*, 1964, 51, 212.
G. F. Sprague (Ed.). Corn and Corn Improvement. N. Y., 1955.
W. Weinberg. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. — *Jahresh. Verein vaterl. Naturk. Württemberg*, 1908, 64, 368. Частично приведено в: C. Stern. The Hardy-Weinberg Law. — *Science*, 1943, 97, 137.

ГЕНЕ

Плод
ной М
фенот
ставл
с тем,
ность
значи
точеч
сий и
всю с
попул
У

хромо
и пара
 лабора
сомы м
мутац
ведя с
 лабора
ми в
чни ау
На пра
сомы
стояни
щие ре

1. Л
особей
лулета
лее 90
2. субе
ния су
3. стер
4. стер

Резу
всех ис
тальну
пример
ных хр
4—14%
огромн
Как
сначала

1 Послед
ников.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОТЯГОЩЕННОСТЬ
И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ПОПУЛЯЦИЮ

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОТЯГОЩЕННОСТЬ ДРОЗОФИЛЫ

Плодовая муха *Drosophila pseudoobscura* широко распространена в Северной Мексике и на востоке США. Почти все отлавливаемые в природе мухи фенотипически одинаковы, если не учитывать половых различий, и представляют собой дикий, или нормальный, тип. Однако нельзя согласиться с тем, что эта однородность фенотипов доказывает генотипическую однородность, так как под диким типом популяции дрозофилы может скрываться значительное генетическое разнообразие в виде изоаллелей, рецессивных точечных мутаций, реципрокных транслокаций, парацентрических инверсий и т. д. Было бы желательно оценить генетическую отягощенность — всю сумму этого генетического разнообразия, имеющегося в природной популяции *D. pseudoobscura*¹.

У *D. pseudoobscura* имеется пять пар хромосом — обычные половые хромосомы X и Y, три пары больших палочковидных аутосом (II, III и IV) и пара аутосом, напоминающих пятнышко (V) (рис. 16—1). Имеется много лабораторных линий этого вида, у которых аутосомы маркированы с помощью различных точечных мутаций и структурных перестроек. Поэтому, проводя соответствующие серии скрещиваний между лабораторными линиями и мухами, отловленными в природе, можно получить сведения о наличии аутосомных мутантов среди мух дикого типа. На практике у отдельных мух дикого типа аутосомы II, III и IV переводят в гомозиготное состояние, чтобы обнаружить у них нижеследующие рецессивные мутации (табл. 16—1):

1. *летали* (мутации, вызывающие гибель всех особей до достижения половой зрелости) или *полулетали* (вызывающие гибель до наступления полового созревания более 90%, но менее 100% мух);
2. *субвитали* (мутации, приводящие к выживанию до половозрелого состояния существенно меньшего, чем в норме, процента мух, но большего 10%);
3. *стерильность самок* (мутации, приводящие к стерильности самок);
4. *стерильность самцов* (мутации, приводящие к стерильности самцов).

Результаты такого исследования сведены в таблицу 16—1. Около 25% всех исследованных аутосом содержат рецессивно летальную или полулетальную мутацию. Рецессивные субвитальные мутации обнаружены примерно в 40% изученных хромосом III и более чем в 90% исследованных хромосом II и IV. Мутации, приводящие к стерильности, имеются в 4—14% изученных хромосом. Очевидно, в природной популяции имеется огромное количество вредных мутаций.

Как эти вредные мутации распределены в популяции мух? Рассмотрим сначала одну из изученных пар аутосом. Каждая хромосома пары с веро-

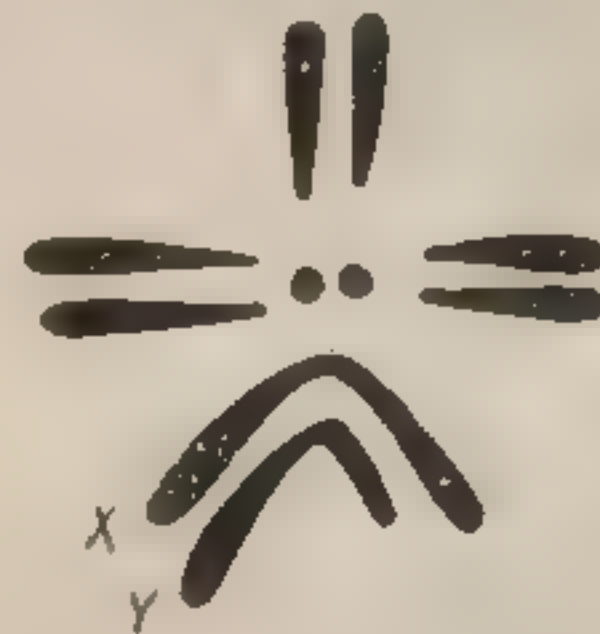


РИС. 16-1.

Хромосомный набор
D. pseudoobscura

¹ Последующее изложение основывается на работах Ф. Добжанского и его сотрудников.

Таблица 16—1

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ГРУЗ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ
D. PSEUDOOBSCURA (ПО Ф. ДОВЖАНСКОМУ)

| Тип мутаций | Процент затронутых хромосом | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----|----|
| | II | III | IV |
| Летальные и полуметальные | 25 | 25 | 26 |
| Субвитальные | 93 | 41 | 95 |
| Приводящие к стерильности самок | 11 | 14 | 4 |
| Приводящие к стерильности самцов | 8 | 11 | 12 |

ятностью 25% содержит леталь или полуметаль и с вероятностью 75% свободна от таких мутаций. Вероятность того, что леталь или полуметаль будет присутствовать в обеих хромосомах пары, равна $(0,25)^2 = 6,25\%$. Из представленных данных нельзя сказать, все ли летали и полуметали, обнаруженные в данной паре аутосом, аллельны (в этом случае до 6,25% зигот в природе должны быть гомозиготными по этим мутациям и не достигать половозрелого состояния), или все мутации затрагивают разные локусы (в этом случае 6,25% зигот должны быть гибридными по сцепленным мутациям такого типа), или же, наконец, имеется какое-то сочетание этих альтернатив. В любом случае вероятность того, что обе хромосомы данной пары не содержат леталей и полуметалей равна $(0,75)^2 = 56\%$.

Какая часть особей популяции не имеет леталей или полуметалей ни в одной из аутосом II, III и IV? Доля таких особей равна произведению $(0,75)^2 \times (0,75)^2 \times (0,75)^2$, т. е. около 17%. Однако, если учесть еще и хромосомы X и Y, в которых также могут быть такие мутации, то частота в природе особей, свободных от леталей и полуметалей, окажется еще меньше. Более того, когда рассматриваются еще и субвитальные мутации (которые составляют наиболее часто выявляемый класс мутаций) и мутации, приводящие к стерильности, то становится ясно, что если в природных популяциях и существуют мухи, свободные от вредных мутаций, то их очень мало.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОТЯГОЩЕННОСТЬ ЧЕЛОВЕКА

Какова генетическая отягощенность человека? Огромное большинство мутаций вредны в гомозиготном состоянии (как уже отмечалось в главе 15). Так как инбридинг повышает частоту гомозигот, то можно оценить генетическую отягощенность в гетерозиготном состоянии, сравнивая ущерб, получаемый инбридируемой частью населения, с ущербом у непобредной части человеческой популяции. Пользуясь переписями сельского населения Франции за последние 100 лет, где перечислены спонтанные аборт, случаи смерти детей и смерти в юности, можно сравнить частоты гибели потомства неродственных родителей с частотой гибели потомства от браков между кузенами¹. Частота гибели потомства неродственных родителей равнялась 0,12, тогда как эта частота в браках кузенов составляла 0,25. Не будем выяснять, какая доля смертей в обычной свободноскрещивающейся популяции людей имеет генетические, а какая — негенетические причины. Можно принять, что избыточная смертность 0,13 (0,25 минус 0,12) имеет генетические причины и вызвана дополнительной

¹ Дальнейшее изложение основано на анализе, проведенном Н. Мортон, Дж. Кроу и Г. Меллером.

гомозиготностью, возникшей в результате браков между кузенами. Это предположение разумно, так как неизвестно какого-либо негенетического фактора, приводящего к большей или меньшей гибели потомства от браков между кузенами, по сравнению с гибелью потомства от неродственных браков. Негенетическое смещение в этих данных могло бы возникнуть, если бы, например, существовал обычай, которого на самом деле нет, — всех детей от браков между кузенами морить голодом.

Следовательно, на 13% больше потомства погибает потому, что родители были кузенами. Полное количество рецессивных леталей, находящихся в популяции в гетерозиготном состоянии, можно подсчитать, если вспомнить (глава 15), что в потомстве браков между кузенами становится гомозиготными $1/16$ всех гетерозиготных генов. В нашей модели половина от $1/16$, или $1/32$ всех особей, должны стать гомозиготными по нормальным генам, а половина от $1/16$, т. е. тоже $1/32$, должны стать гомозиготными по соответствующим ненормальным аллелям. Поэтому, чтобы оценить полное количество гетерозигот по мутациям, которые летальны в гомозиготном состоянии, нужно умножить 0,13 на 32. Получается величина, равная примерно 4. Эти 400% представляют собой вероятность того, что обычный организм обладает вредными мутациями, которые находятся в гетерозиготном состоянии и которые, будучи в гомозиготном состоянии, были бы летальными. Другими словами, у каждого человека есть в среднем четыре летальных эквивалента в гетерозиготном состоянии, или в четыре раза больше вредных мутаций, чем требуется для того, чтобы человек умер, если бы эти гены стали каким-то образом гомозиготными.

Предыдущий анализ не выявил числа генов, участвующих в образовании четырех летальных эквивалентов. Эти летальные эквиваленты могут составлять находящиеся в гетерозиготном состоянии четыре рецессивных летали, или восемь мутаций, дающих 50% выживаемости, или шестнадцать мутаций с 25%-ной выживаемостью, или же любую комбинацию вредных мутаций, которые в сумме составляют четыре летальных эквивалента. Возможно, что эффект тех же мутаций в современном обществе должен составлять менее четырех летальных эквивалентов, так как за прошедшие 100 лет улучшились жилищные условия, питание и медицинская помощь. По тем же причинам следует ожидать, что вредные эффекты этих мутаций в гетерозиготном состоянии сейчас несколько слабее, чем сто лет тому назад. В прошлом веке некоторая частная гипотетическая гомозиготная комбинация, обладающая переменной пенетрантностью и экспрессивностью, не давала обнаружимого эффекта в 25% случаев, вредного эффекта (но не смерти до половозрелого состояния) в 15% случаев и гибели до полового созревания в 60%; в настоящее время соответствующие значения равны 50, 10, 40%. 100 лет тому назад эта комбинация должна была давать 0,6 летального эквивалента; сейчас она дает 0,4. Отметим также, что вредность (но не летальность до половой зрелости) должна была также снизиться за этот период с 15 до 10% или, если это выразить в эквивалентах вредности, вместо 0,15 теперь должно быть 0,10. По-видимому, гены, ответственные за эквиваленты летальности и вредности, должны быть, хотя бы частично, одними и теми же.

Ясно, что у современного человека имеется генетическая отягощенность. Некоторые из мутаций, переданных ему по наследству, возникли у его родителей (вероятно, 2 из каждых 5 зигот содержат, как указывалось на стр. 206, заново возникшую мутацию), другие возникли у его более далеких предков. Г. Меллер и Х. Слатис подсчитали, что в среднем каждый из нас, вероятно, гетерозиготен не менее чем по 8 таким мутантным генам, не считая мутаций, находящихся в гомозиготном состоянии. Что же происходит с этим грузом мутаций в ряду поколений?

УРАВНОВЕШЕННАЯ И МУТАЦИОННАЯ ОТЯГОЩЕННОСТЬ

Чтобы предсказать в общем виде судьбу «обычной» мутации в популяции, нужно определить ее «обычный» фенотипический эффект (В. Wallace, 1963; J. F. Crow и R. G. Temin, 1964; Th. Dobzhansky, 1964). Так как обычно мутация в гомозиготном состоянии вредна (хотя бы в какой-то степени), то имеется тенденция к элиминированию из генофонда ее гомозиготного состояния. Однако, когда мутация находится в гетерозиготном состоянии, возможны два противоположных эффекта (см. главу 15): либо гетерозигота превосходит любую из гомозигот (как оказывается в малярийных районах для гена, вызывающего серповидноклеточную анемию), либо она несколько хуже немутантной гомозиготы (что получается для большинства гетерозигот по рецессивным точечным леталем). В первом случае эффект гетерозиса стремится увеличить частоту мутации в популяции, и оба варианта гена, мутантный и нормальный, сохраняются в равновесии в генофонде популяции. Поэтому в популяции, в генофонде которой сохраняется более одной генной (или хромосомной) альтернативы, обнаруживается *сбалансированный полиморфизм* фенотипов. Соответствующая группа мутаций сбалансирована и представляет собой *уравновешенную отягощенность*. Если же гетерозигота хуже одной из гомозигот, то гетерозиготное состояние увеличивает скорость элиминирования соответствующей мутации из генофонда, и популяция проявляет неравновесный полиморфизм и стремится стать генотипически и фенотипически мономорфной. Эта группа мутаций, создающая *мутационную отягощенность*, сохраняется в популяции в основном за счет периодически возникающих вновь мутаций. Полученные на дрозофиле экспериментальные данные (Г. Меллера и сотр., К. Стерна и сотр., Дж. Кроу и сотр., И. Гершковича и Р. Баумиллера и сотр.) и статистический анализ данных для человека (на основании анализа, проведенного Н. Мортоном), подтверждают точку зрения, согласно которой подавляющее большинство точечных мутаций вредны в гетерозиготном состоянии. Поэтому мы будем считать, что большую часть генетической отягощенности составляет мутационная отягощенность.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СМЕРТЬ

Каким образом мутантный ген элиминируется из популяции? Он элиминируется не только вследствие гибели особи, хотя иногда это происходит именно так. Более общим способом устранения мутантного гена из генофонда оказывается *генетическая смерть* — неспособность организма, несущего мутацию, дать обладающих этой мутацией потомков. Так, если у особи не может быть детей, то все гены этой особи, как мутантные, так и нормальные, обречены на генетическую смерть. Так как мутации стабильны, то они обычно удаляются из генофонда в результате генетической смерти и лишь в редких случаях в результате мутирования.

Человек с доминантной леталью, например, с ретинобластомой, генетически умирает (так же, как и умирает физически). В этом случае мутантный ген исчезает из популяции в том же поколении, в котором он появился. Поэтому его *период существования* составляет лишь одну генерацию. Доминантная вредная мутация с коэффициентом отбора 0,2 (и, следовательно, с адаптивной ценностью 0,8 по сравнению с нормальным геном) будет существовать вплоть до того момента, когда она генетически погибнет, в среднем в течение пяти поколений. Так как величина популяции для следующих друг за другом поколений примерно одинакова, то в каждой генерации организм, несущий мутацию, с вероятностью 20% не передает мутацию потомству. После того как эта мутация возникла, ее иногда не удается передать даже следующему поколению; она может генетически погибнуть на пятом или на десятом поколении, но в среднем мутация суще-

ствует пять поколений. Длительность ее существования сохраняет свое значение и в том случае, когда генетический дрейф, миграция или другие факторы вызывают флуктуации частоты мутации.

Рассмотрим судьбу в популяции некоего редкого рецессивно-летального гена, подобного гену ювенильной амавротической идиотии. Всегда, когда получается гомозигота по этому гену, она генетически погибает, и из генофонда исчезают сразу два мутантных гена. Теперь проследим судьбу гетерозигот, которые встречаются в 600 раз чаще (см. главу 15) и содержат 300 тех же мутантных генов, которые образуют гомозиготы. Обычно примерно 2% гетерозигот по рецессивной летали генетически гибнут (см. стр. 209); следовательно, генетически умирать должны примерно $0,02 \times 600 = 12$ гетерозиготных индивидов, что приводит к элиминированию 24 генов, 12 из которых относятся к рецессивно летальным аллелям. Соответственно, в гетерозиготах генетической смерти подвергается в 6 раз больше таких мутантных рецессивно летальных генов, чем в гомозиготах по этой мутации, хотя снижение репродуктивного потенциала у гетерозигот составляет лишь $\frac{1}{50}$ от его снижения в случае гомозигот.

Очевидно, чем реже мутация, тем меньше должна быть среди случаев генетической смерти доля гомозигот и тем больше — доля гетерозигот. В случае редких мутаций естественный отбор элиминирует мутантные гены главным образом посредством генетической смерти гетерозигот. Поэтому с точки зрения популяции и генофонда небольшой вред, приносимый геном в гетерозиготном состоянии, оказывается существенно более вредного эффекта этого гена в гомозиготном состоянии. Однако в смысле влияния на репродуктивный потенциал каждая редкая мутация одинаково вредна для популяции постоянной величины, где любая из них в конечном счете приводит к генетической смерти. Так, действующая в качестве доминантной летали гипоплоидия существует до генетической смерти всего одно поколение; редкая же точечная мутация, снижающая плодовитость всего на 0,001, будет существовать до генетической смерти в среднем тысячу поколений.

Обратимся теперь к большим хромосомным аномалиям, которые вызывают гибель организма *in utero*, т. е. еще во внутриутробном периоде развития. Такая гибель может произойти как бессимптомный аборт, и поэтому и пораженные индивиды, и их родители страдают не долго. С другой стороны, особи, уже прошедшие репродуктивную стадию — и поэтому генетически либо не умершие, либо уже погибшие вследствие точечных мутаций в гетерозиготном состоянии, продолжают подвергаться небольшим вредным проявлениям гетерозиготности, как бывшим ранее, так и появляющимся заново. Эти проявления добавляются к их болям и мучениям и к их восприимчивости к болезням. Следовательно, мутация, слабо влияющая на репродуктивный потенциал, может привести к большим страданиям, чем сильно влияющая на него мутация, вследствие удлинения периода существования и прямо связанного с ним увеличения тяжести нарушений в после-репродуктивном периоде жизни. В общем, если смотреть не с точки зрения биологической приспособленности, а с точки зрения страданий в человеческой популяции, то «наименее вредные» в гетерозиготном состоянии точечные мутации окажутся наиболее вредными.

На первый взгляд может показаться, что медицина способна уменьшить человеческие страдания, вызванные генами. Такая возможность существует, в частности, для человека, страдающего диабетом и принимающего инсулин. Нет сомнений, что он чувствует себя лучше, чем если бы ему не оказывалась медицинская помощь. Но следует помнить, что медицина не оказывалась медицинская помощь. Но следует помнить, что медицина не может вылечить генетический дефект. Более того, увеличивая репродуктивный потенциал больного диабетом, медицина удлиняет период существования соответствующих мутаций, и генетическая смерть, которая

должна, в конце концов, наступить, лишь откладывается до появления позднейшего поколения — каждое поколение требует такого же лечения. Человеческие страдания будут уменьшаться лишь в том случае, если медицина сможет исправить нарушение, вызванное генами. Чтобы исправить все многочисленные эффекты мутации, медицина должна заменить первичный продукт дефектного гена нормальным продуктом. Поскольку большинство известных сейчас лекарств, если не все, влияют не на самую раннюю стадию действия гена, а на стадии более поздние (глава 6), то они и устраняют лишь некоторые вредные эффекты, приводя к увеличению человеческих страданий из-за удлинения периода существования мутации. К несчастью, это положение будет сохраняться до тех пор, пока медицина не продвинется намного дальше.

На основании выше сказанного можно принять, что в генофонде существуют эуплоидные или почти эуплоидные мутации и они-то и ответственны главным образом за изменения в составе генофонда в ходе эволюции.

МУТАЦИИ И ЭВОЛЮЦИЯ

В главе 15 мы лишь предположили, что мутации могут служить исходным материалом для биологической эволюции. Наша нерешительность в определении эволюции как естественного результата изменений генофонда была следствием того, что огромное большинство мутаций, включая точечные, вредны в гомозиготном или гемизиготном состоянии. В этой главе и в главе 15 мы показали, что большинство мутаций вредны также и в гетерозиготном состоянии. Как же при этом мутации могут привести к более приспособленным генотипам, появление которых представляется необходимым условием эволюции? Для данного генотипа при данных условиях внешней среды большинство точечных мутаций действительно вредны; возможно, лишь одна точечная мутация из тысячи незначительно увеличивает репродуктивный потенциал мутанта. Несмотря на это, редкие выгодные мутации дают популяции возможность стать более приспособленной при условии, что скорость мутирования не слишком велика и происходит достаточное количество генетических рекомбинаций. Более того, мутации, понижающие биологическую приспособленность при одних условиях внешней среды, могут стать выгоднее нормальных генов при других условиях (Th. Dobzhansky, 1964). Например, мутация, вызывающая появление у дрозофилы зачаточных крыльев, в среде, где выгодно умение летать, естественно, хуже своей нормальной генетической альтернативы. Но эта же мутация должна быть выгодной для дрозофил, живущих на маленьком острове, где летать не только не нужно, но просто вредно: летающие насекомые будут отнесены ветром в море и погибнут. Рассмотрим другой пример. Несколько десятилетий тому назад во внешней среде не было ДДТ, и мутанты, невосприимчивые к ДДТ, были несомненно менее приспособленными, чем обладавшие нормальным геном. Но когда в среду, окружающую насекомых, был внесен ДДТ, то такие мутации — даже если они и вредны в других отношениях — давали при воспроизведении потомства такое огромное преимущество по сравнению с альтернативными состояниями гена, что они закрепились в популяции в качестве нового гена дикого типа. Можно было бы привести и другие примеры, в том числе мутации устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов, которые в среде без антибиотика приспособлены хуже, чем нормальные генотипы.

Поэтому ясно, что мутирование позволяет популяции лучше приспособиться к условиям существования. Мутирование дает также сырой материал, необходимый для расширения ареала популяции и включения в него тех условий, которые где-то существуют или когда-либо будут существовать. Той популяции, которая уже весьма хорошо адаптировалась к

окружающей ее сейчас среде, возникновение мутаций заметно вредит. Но окружающая среда различна, и любые условия в конце концов изменятся, так что немутуирующая популяция, хотя и преуспевавшая когда-то, при нормальном течении событий придет, в конце концов, к вымиранию. Поэтому мутирование представляет собой ту цену, которую платит популяция за свою будущую приспособленность к тем или иным условиям среды. Теперь мы можем понять, что происхождение более приспособленных генотипов определяется в основном мутированием и отбором вместе с генетическим дрейфом и миграцией. Мы можем также лучше понять пользу, которую приносят генетические рекомбинации, ускоряющие появление приспособленных генотипов, а также важность генетического механизма, регулирующего частоту мутирования.

СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ

Принимая во внимание изложенное выше, нетрудно предсказать последствия несомненного увеличения частоты мутирования у человека в результате облучения проникающей радиацией или в результате воздействия некоторых активных химических веществ. Как индуцированные искусственно, так и спонтанные мутации могут происходить и в соматических, и в половых клетках. Однако соматические мутации, конечно, ограничены лишь тем индивидуумом, у которого они возникли. Чем раньше в жизни человека произошла мутация, тем больше участок соматической ткани, который происходит из мутантной клетки.

Когда зрелый организм подвергается действию агента, вызывающего мутации в определенном проценте клеток, то клетки с индуцированными мутациями будут обычно окружены немутантными клетками той же ткани; их общее действие приводит к почти нормальному фенотипическому эффекту. Когда же воздействию подвергается зародыш, то мутации возникают в пропорционально меньшем количестве его клеток. Однако мутантные клетки зародыша приведут позднее к целиком дефектным тканям или органам. В таких случаях нет компенсаторного действия нормальной ткани. Более того, многие мутации влияют на скорость клеточного деления; поэтому чем раньше в развитии организма они возникают, тем больше отклоняется от нормы размер получающейся структуры. Отсюда понятно, что, если мутабельность клеток на всех стадиях развития одинакова, то чем раньше в развитии организма произошла соматическая мутация, тем к большему нарушению она приводит.

Почти все соматические повреждения происходят, когда заново возникающая мутация оказывается в гетерозиготном состоянии, так как при этом она затрагивает локус, остающийся немутантным в другом геноме клетки. Хотя соматические мутации не передаются следующему поколению, они могут понижать репродуктивные потенциалы организмов, в которых они возникли, воздействуя таким образом на генофонд следующего поколения.

Нарушение, к которому приводит возникающая в соматической клетке мутация, зависит от того, делится ли клетка после появления мутации. Некоторые высокодифференцированные клетки человеческого организма (нервные клетки или клетки, выстилающие внутреннюю поверхность тонких кишок) не делятся. В этих случаях обычно трудно обнаружить мутации, так как у клеток нет потомства, среди которого можно было бы выделить мутантов. Неделаящиеся клетки могут отличаться по мутабельности от тех, которые сохраняют способность делиться. Так или иначе, в неделящихся клетках могут происходить различные мутации, в том числе и точечные, которые инактивируют имеющийся аллель или изменяют его тип, а также и структурные перестройки любой величины. Тем не менее неделящиеся клетки остаются эуплоидными или почти эуплоидными

и нарушение фенотипа должно вызываться почти исключительно точечными мутациями в гетерозиготном состоянии и изменениями положения генов. Неуделяющиеся клетки, вероятно, очень редко погибают сразу же после возникновения мутаций, хотя они могут сильно нарушить функционирование клеток и создать впечатление их преждевременного старения.

Несмотря на то, что в делящихся соматических клетках возникают такие же типы мутаций, что и в неделящихся, деление ядра может привести к резко выраженной анеупloidии (главы 11 и 12). Соответственно, большинство нарушений фенотипа делящихся клеток в результате индуцированных мутаций происходит из-за анеупloidности, главным образом вследствие единичных невосстановившихся разрывов. Следует отметить, что все известные агенты, вызывающие точечные мутации, приводят также и к разрывам хромосом.

ГЕРМИНАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ

Приведенное выше обсуждение эффекта соматических мутаций соответствует названию этой главы, так как соматические клетки составляют популяцию, образованную при бесполом размножении (деление клеток). Рассмотрим теперь в общем виде последствия увеличения частоты мутаций в половых клетках человека. Чем раньше в линии половых клеток возникает мутация, тем больше будет доля половых клеток, несущих эту новую мутацию. Верхний предел доли гамет, несущих какую-то определенную индуцированную мутацию, конечно, равен 50%. Рассмотрим влияние облучения гонад каждого поколения определенной дозой проникающей радиации (рис. 16-2). Предполагается, что груз спонтанных мутаций находится в равновесии — скорость возникновения мутаций равна скорости исчезновения их в результате генетической смерти. Начиная с первого поколения, которое получило дополнительную дозу радиации, мутационная отягощенность возрастает с каждым поколением до тех пор, пока не будет достигнуто новое равновесие. В этот момент возросшее число генетических смертей на поколение равно возросшему числу новых мутаций, возникающих в каждом поколении. Если прекратить дополнительное облучение на некотором более позднем поколении, то мутационная отягощенность будет постепенно (из-за вариаций в периодах существования) уменьшаться в результате генетической гибели, пока не будет достигнут опять исходный уровень равновесия для груза спонтанных мутаций.

Очевидна важность детального изучения генетических эффектов проникающего излучения. Чтобы произвести наилучшую оценку, нам нужно гораздо больше знать о распределении энергии различных излучений в ткани и о точной дозе облучения гонад разными типами излучений; о вредности индуцированных мутаций в гетерозиготном и гомозиготном состояниях и о периоде существования мутаций; наконец, о различных типах и частотах мутаций, вызываемых каждым видом излучения на разных стадиях мужского и женского гаметогенеза.

Для решения последнего вопроса нужно, в частности, определить относительную мутагенность концентрированной и растянутой доз для

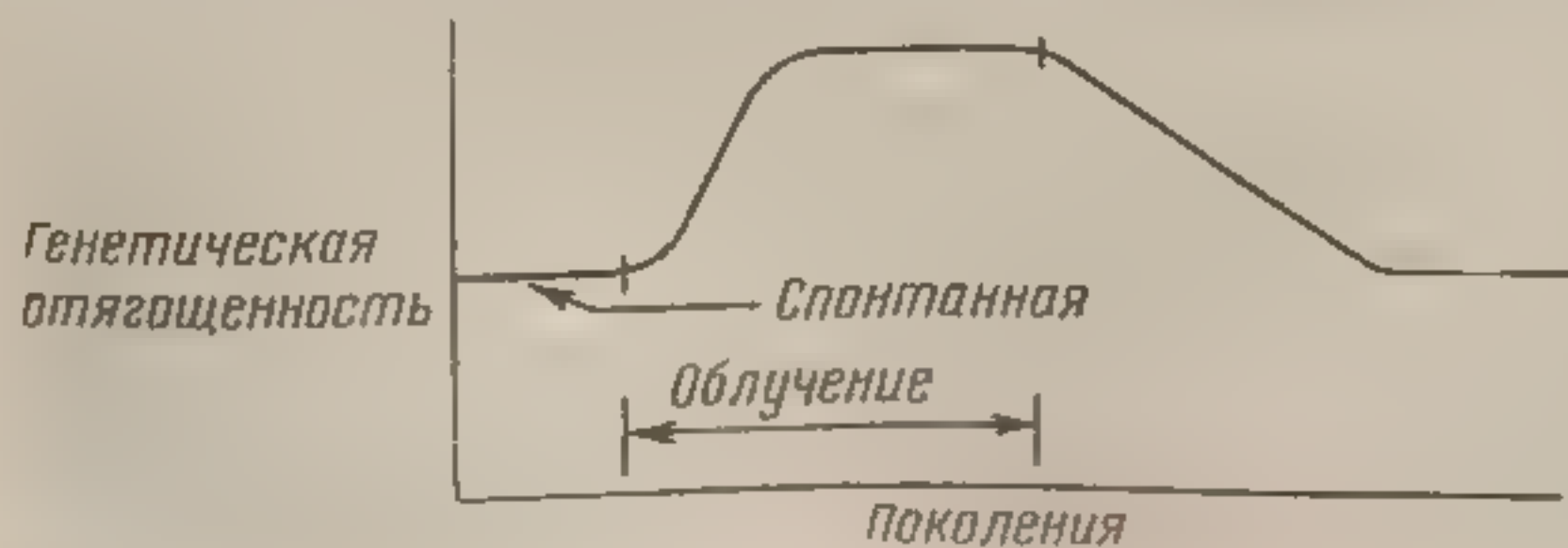


РИС. 16-2.

Генетическая отягощенность и облучение

разных типов мутаций. Нужно так же как можно точнее изучить мутабельность сперматогоний и овоцитов, так как это именно те стадии, в которых на протяжении наибольшего времени сохраняются половые клетки человека, дающие следующее поколение. Существует мнение, согласно которому наибольшее число мутаций в половых клетках возникает в овоцитах. Так как сперматогонии постоянно делятся, то среди них может произойти отбор против мутаций, дающих вредный эффект, так что частота мутаций уменьшается ко времени образования гамет. Женщина, напротив, рождается со всеми, или почти со всеми, ее будущими гаметами уже на стадии овоцита, так что в этой линии половых клеток нет параллельного митотического отбора. Овоциты не только не проходят митоз, они остаются относительно неактивными на протяжении десятилетий, пока не станут яйцеклетками. Так как в течение этого периода овоциты стареют, то они становятся непропорционально чувствительными к спонтанному мутированию — по крайней мере к воздействию факторов, которые приводят к анеусомии.

Сейчас мы недостаточно знаем об этих факторах. Однако информация, которая имеется в нашем распоряжении, все-таки позволяет дать пусть приблизительный ответ (см. ссылки в конце этой главы). Отметим, что все значения, которые использованы в следующих далее рассуждениях, могут отличаться от истинных по крайней мере вдвое.

Существует традиция рассматривать влияние излучения на половые клетки через увеличение частоты спонтанных мутаций за счет облучения. Общее впечатление таково, что человек, как вид, довольно хорошо приспособлен к присущей ему скорости спонтанного мутирования и что удвоение этой скорости не угрожает его жизнеспособности. В связи с этим встает вопрос о том, какое количество искусственной радиации даст столько же мутаций, сколько их возникает в норме? В одном из официальных документов США подсчитано, что для удвоения скорости спонтанного мутирования человека — частоты, приходящейся на одно поколение, — достаточно примерно 30 рад (около 30 р). Это количество было названо удваивающей дозой. Вычислено, что в одномиллионной группе населения облучение гонад (половых органов) каждого человека в дозе 1 рад дает от 100 до 4000 мутаций, которые могут передаваться следующим поколениям. Таким образом, облучение гонад одного поколения в дозе 1 рад приведет к рождению от 100 до 4000 людей с новыми мутациями в гетерозиготном состоянии. Затронутые мутациями потомки будут появляться в течение многих поколений, так как в первом поколении генетически погибнет лишь небольшая часть этих мутаций. Генетические смерти вследствие новых мутаций не будут заметны на фоне генетических смертей, происходящих в результате спонтанных мутаций. Если облучение гонад дозой в 1 рад будет повторяться в отношении каждого поколения, то постепенно установится равновесие, при котором в каждом поколении у 100—4000 человек из миллиона будет обнаруживаться в виде генетической смерти действие мутаций, индуцированных облучением. Поскольку фенотипические эффекты мутаций, индуцированных облучением, не отличаются от эффектов мутаций, возникающих спонтанно, то мы не сможем выделить людей, которым вред принесло именно облучение.

Какая часть нашей обычной мутационной отягощенности обусловлена естественным фоном проникающего излучения? Так как человек за репродуктивный период, т. е. за 30 лет, получает примерно 5 рад, то возможно, что облучением обусловлены лишь $\frac{5}{30}$, или $\frac{1}{6}$, наших обычных мутаций.

Какому дополнительному облучению подвергаемся мы при медицинском обслуживании? Если использование излучений в медицинских целях продолжало бы оставаться на современном уровне, то половые клетки каждого жителя США получили бы суммарную дозу порядка 3 р на

1 поколение. Конечно, некоторые люди не получают этой дозы, а облучение других заметно выше. Но эта средняя доза облучения половых клеток только в медицинских целях составляет 60% от дозы, получаемой спонтанно, и повышает скорость мутирования примерно на 10% по сравнению со спонтанной. В будущем, с увеличением использования излучений для диагностики и лечения, средняя доза при медицинском облучении может сильно возрасти. В настоящее время радиоактивные материалы уже используются в одном миллионе медицинских процедур в год. Многие медицинские учреждения исследуют роль подобного облучения и вводят различные способы снижения дозы облучения без уменьшения получаемой от него пользы.

Трудно определить в половых клетках число мутаций, обусловленных облучением, связанным с радиоактивными осадками в результате атомных взрывов, так как достигающее гонады излучение может быть вызвано осадками, выпавшими на землю, а также попавшими в организм при дыхании или вместе с пищей. Особенности распределения в теле различных радиоактивных веществ приводят к значительным различиям в количестве излучения, достигающего половых клеток. Для половых клеток наиболее существенными радиоактивными веществами в осадках оказываются цезий-137, стронций-90 и углерод-14. Цезий распределяется по тканям, включая гонады, более или менее равномерно, тогда как стронций накапливается преимущественно в костях. Поэтому можно ожидать, что поглощенный из осадков цезий-137 приводит к более значительному повреждению гонад, чем стронций-90.

Различается также и время, в течение которого радиоактивные вещества вызывают новые мутации. Индукция мутаций такими относительно короткоживущими радиоактивными веществами, как стронций-90 или цезий-137, ограничена почти исключительно несколькими поколениями. Углерод-14 (C^{14}), наоборот, относится к долгоживущим изотопам; период его полураспада составляет 6000 лет. Так что, если в среду не поступают новые порции C^{14} , то и через 200 поколений он будет индуцировать лишь примерно вдвое меньше мутаций, чем в первом поколении. Подсчитано, что вследствие высокой концентрации и большой длительности полураспада вероятность облучать гонады для C^{14} в 4—17 раз выше, чем для радиоактивных цезия и стронция, вместе взятых. Поэтому C^{14} способен вызывать пропорционально больше точечных мутаций.

В отчете Национального исследовательского совета Национальной академии наук США за 1956 г. (см. ссылки) ожидаемая гонадная доза от радиоактивных осадков, если с прежней скоростью продолжался бы испытания оружия того же типа, была определена на ближайшие 30 лет примерно в 0,1 рад. На основании этого отчета мы можем ожидать примерно от 10 до 400 мутаций на миллион человек. Какие изменения нужно внести в эту картину, чтобы привести ее в соответствие с сегодняшним днем? Чтобы точно оценить мутационную вредность радиоактивных осадков для половых клеток, нужно принять во внимание, среди прочих, следующие факты:

1. В упомянутом отчете не учитывалась большая величина периода полураспада углерода-14.
2. Изменение частоты испытаний (согласно данным Комиссии по атомной энергии США только в 1958 г. количество дающего осадки радиоактивного материала в стратосфере удвоилось в результате многочисленных взрывов при испытаниях ядерного оружия).
3. Неравномерное распределение осадков на земном шаре.
4. Уменьшение доли распада, происходящего в стратосфере, так как оказалось, что осадки выпадают гораздо быстрее, чем считали раньше.
5. Изменение типа испытываемых бомб и изменение мест проведения испытаний.

6. Уменьшение опасности облучения в результате заключения договора о запрещении испытаний.

Ежемесячно появляются новые данные, необходимые для оценки риска, которому подвергаются половые клетки из-за радиоактивных осадков. По-видимому, возможный вред был недооценен. В 1953 г. Международная комиссия по радиологической защите рекомендовала, а различные правительственные ведомства США приняли 80 единиц в качестве максимально допустимой концентрации стронция-90 в пищевых продуктах. В 1958 г. та же Комиссия рекомендовала снизить этот максимум до 33 единиц, и это новое значение было впоследствии принято к руководству правительством США.

В принципе облучение искусственно вызванной радиацией несомненно приводит к точечным мутациям в соматических и половых клетках человека. Но показать эту возможность на практике трудно по двум причинам. Во-первых, ожидаемые точечные мутации качественно не отличаются от возникающих спонтанно. Во-вторых, количественный эффект, хотя в общем и большой, в каждом отдельном поколении настолько мал, что маскируется обычным разнообразием генотипов человека и многообразием среды. Однако с усовершенствованием статистических методов возможность доказать, что радиация действительно вызывает такие генетические эффекты, сильно возросла. С другой стороны, доказано, что излучение может вызывать структурные перестройки в хромосомах человека. Совершенство современных цитологических методов исследования хромосом человека и сравнительно высокая частота анеуплоидии в овоцитах позволяют надеяться, что в будущем появятся дополнительные данные о числе и типах больших хромосомных мутаций, индуцированных у человека при разных типах и дозах излучений.

Обсуждая генетические эффекты малых доз излучения, мы узнали об опасности, которая, казалось, не должна быть пагубной для генофонда человечества. Однако очень высокие дозы облучения при ядерной войне были бы губительны, так как если все тело человека получает за короткое время 500 р, то вероятность гибели облученного в течение ближайших месяцев равна 50%. Если человек переживает этот период, то его жизнь ограничена несколькими годами, возможно вследствие соматических мутаций. Детям, зачатым после облучения, будут угрожать многочисленные вредные мутации. Возможно даже, хотя и не представляется вероятным, что в случае ядерной войны облучение будет таково, что его хватит для уничтожения человеческого рода.

Наконец, нужно себе представлять, что мы постоянно подвергаемся действию искусственных мутагенных химических соединений. Скорее всего от химических веществ в половых клетках возникает меньше мутаций, чем от облучения. Однако количество соматических мутаций, возникших под действием химических веществ, может оказаться больше числа соматических мутаций вследствие облучения, которому мы подвергаемся в настоящее время.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перекрестно-оплодотворяющиеся виды несут огромное количество мутаций в гетерозиготном состоянии. Подавляющее большинство их вредно в гомозиготном и — в меньшей степени — в гетерозиготном состоянии. При прочих равных условиях почти все мутации одинаково вредны в том смысле, что все они вызывают в конце концов генетическую смерть. Мутации, вызывающие наименьшее снижение репродуктивного потенциала, приводят к наибольшим страданиям. Редко встречающиеся мутации приносят больше вреда и приводят к большему количеству генетических смертей.

в гетерозиготном, чем в гомозиготном состоянии. Период существования мутации в популяции обратно пропорционален ее коэффициенту отбора.

Мутирование — это та цена, которую популяция платит сейчас за возможность иметь в будущем в той же или изменившейся среде более высокие репродуктивные потенциалы. Так, несмотря на малую частоту мутаций, увеличивающих репродуктивные потенциалы в существующих условиях, мутации создают сырье для эволюции.

Естественные и искусственные проникающие излучения несомненно вызывают мутации в наших соматических и половых клетках, увеличивая бремя вредных мутаций. Это облучение, хотя и вредное, вероятно не угрожает сейчас существованию человека как вида, хотя и может угрожать ему в будущем, если облучение станет достаточно сильным. Необходимы дальнейшие исследования для точного определения действия проникающих излучений и химических соединений на скорость мутирования у человека и на его благополучие.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

16.1. Думаете ли Вы, что возникающие у человека мутации чем-то полезны? Почему?

16.2. Сравните судьбу груза мутаций в гаплоидных, диплоидных и аутотетраплоидных популяциях, размножающихся неполовым путем.

16.3. Обсудите влияние на генофонд мутаций, ограниченных лишь соматическими клетками.

16.4. Может ли ген, содержащий фенотипический эквивалент вредности, одновременно содержать и летальный эквивалент? Объясните.

16.5. Приведите примеры сбалансированного и несбалансированного полиморфизма в генетике человека.

16.6. Какая связь имеется между фенотипической вредностью, генетической смертью и периодом существования мутации?

16.7. Обсудите относительную важность для особи и для популяции точечных мутаций и больших структурных перестроек хромосом.

16.8. В чем различие, с точки зрения мутирования, между максимально допустимой дозой и удваивающей дозой ионизирующего излучения? Безопасна ли, с мутационной точки зрения, какая-либо доза какого-либо ионизирующего излучения? Объясните.

16.9. Сравните генетический состав груза мутаций, вызванных радиоактивными осадками, использованием излучений в медицинских целях и авариями атомных реакторов.

16.10. Действительно ли важно для генетиков ознакомиться с генетическими эффектами излучения? Почему?

16.11. Каковы пути полезного применения радиации в медицине? Основаны ли некоторые из них на воздействии излучения на гены? Если Вы ответили утвердительно, то приведите примеры.

16.12. В состав радиоактивных осадков входит радиоактивный йод, I^{131} , период полураспада которого около недели. Обсудите ожидаемые генетические эффекты в соматических и половых клетках людей, подвергшихся действию таких осадков.

16.13. Восприимчивость к проказе обусловлена, возможно, отдельным неполнопроявляющимся доминантным геном. С. Г. Спикетт отметил, что бывают вспышки проказы в некоторых популяциях, которые в течение многих поколений были свободны от этой болезни. Перечислите некоторые факторы, которые могут приводить к этому.

16.14. Был ли генотип человека, хорошо приспособленного в наше время, столь же приспособленным 2000 или 20 000 лет назад? Объясните.

16.15. «Опасность мутаций заключается главным образом в скорости их возникновения». Обсудите это утверждение.

16.16. Как можно объяснить тот факт, что в роде дрозофил, по-видимому, наиболее тяжелый генетический груз несут обыкновенные и экологически наиболее подвижные виды, тогда как у редких и специализированных видов, а также в пограничных колониях обыкновенных видов этот груз оказывается самым легким?

ЛИТЕРАТУРА

- Ш. Ауэрбах. Генетика в атомный век. М., Атомиздат, 1959.
- Background Material for the Development of Radiation Protection Standards. Rept. N 1, Federal Radiat. Council. Washington, 1960.
- E. H. Y. Chu, N. H. Giles, K. Passano. Types and Frequencies of Human Chromosome Aberrations Induced by X-rays.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 830.
- J. F. Crow. Ionizing Radiation and Evolution.— Scient. Amer., 1959, 201, 138.
- J. F. Crow, R. G. Temin. Evidence for Partial Dominance of Recessive Lethal Genes in Natural Populations of *Drosophila*.— Amer. Naturalist, 1964, 98, 21.
- Th. Dobzhansky. Evolution, Genetics and Man. N. Y., 1955.
- Th. Dobzhansky. How Do the Genetic Loads Affect the Fitness of Their Carriers in *Drosophila* Populations? — Amer. Naturalist, 1964, 98, 151.
- I. H. Herskowitz. Birth Defects and Chromosome Changes.— Nucl. Information, 1960, 3, 4.
- H. Krieger, N. Freire-Maia. Estimate of the Load of Mutations in Homogeneous Populations from Data on Mixed Samples.— Genetics, 1961, 46, 1565.
- N. E. Morton. The Mutational Load Due to Detrimental Genes in Man.— Amer. J. Human Genet., 1960, 12.
- H. J. Muller. Mutational Prophylaxis.— Bull. N. Y. Acad. Med., 2nd ser., 1948, 24, 447.
- H. J. Muller. Radiation Damage to the Genetic Material.— Amer. Scientist, 1950, 38, 33, 126, 399.
- A. Müntzing. A Case of Preserved Heterozygosity in Rye in Spite of Long-Continued Inbreeding.— Hereditas, 1963, 50, 377.
- Report of the United. N. Scient. Comm. Effects Atomic Radiat. N. Y., Gen. Assembly Official Rec. 13th Session, Suppl. 17 (A/3838), Chaps. 5—6, Annexes G-1, 1958.
- Selected Materials on Radiation Protection Criteria and Standards: Their Basis and Use. Joint Comm. Atomic Energ. Congr. United States. Washington, 1960.
- The Biological Effects of Atomic Radiation. Summary Reports. Washington, D. C.: Nat. Acad. Sci.-Nat. Res. Council, 1956 and 1960.
- B. Wallace. A Comparison of the Viability Effects of Chromosomes in Heterozygous and Homozygous Condition.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 801.

ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ,
ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В ПРИРОДЕЭНОТЕРА¹

Ослинник (*Oenothera*, рис. 17—1) представляет собой обычный сорняк, встречающийся на обочинах дорог, железнодорожных откосах, на заброшенных полях. В природе это растение существует в виде многочисленных чистых самоопыляющихся линий, у каждой из которых свой характерный фенотип. В лаборатории можно провести перекрестное опыление этих линий. Если скрещиваются линии *Lamarckiana* и *biennis*, то получается удивительное потомство F_1 . Во-первых, не все гибриды F_1 имеют одинаковый фенотип, как можно было бы ожидать, исходя из опыта работы по скрещиванию двух чистых линий, а содержит три разных типа (которые мы будем называть А, Б и В). Во-вторых, каждый из этих трех типов в потомстве F_1 при самоопылении разводится как чистая линия. Если бы потомство F_1 было гибридным, то следовало бы ожидать, что при его самоопылении получатся рекомбинанты и, следовательно, потомство с несколькими различными фенотипами. Эти две особенности энотеры проиллюстрированы на рис. 17—2, где рядом показаны результаты, получающиеся при аналогичных скрещиваниях садового гороха. Из результатов, полученных

на энотере, мы должны сделать вывод, что самооплодотворяющиеся линии нельзя автоматически считать чистыми гомозиготными линиями, а это противоречит тому, что говорилось в главе 1. Чтобы в потомстве F_1 получились три разных генотипа, необходимо, чтобы хотя одна из линий *Lamarckiana* или *biennis* была гетерозиготной. Допустим, что *Lamarckiana* гетерозиготна по одной лишь паре генов. Если это так, то как же эта линия при самоопылении может дать растения только типа *Lamarckiana*? Для этого нужно, чтобы гетерозиготное растение давало только гетерозиготное потомство. Но допустим, что при самоопылении, как и ожидается, образуются гомозиготы двух типов, но оба эти типа летальны. [Вспомним, что у желтой мыши



РИС. 17-1.
Энотера (R. Cleland)

¹ По работам Г. де Фриза, О. Реннера, Р. Келланда, Ф. Элкерса, А. Блексли, Дж. Беллингга, С. Эммерсона и А. Стертеванта.

(см. стр. 76) летальна лишь одна гомозигота, другая жизнеспособна. В данном же случае два разных аллеля должны действовать как рецессивные летали. Эта гипотеза предсказывает, что у *Lamarckiana* половина зигот погибает до того, как растение созреет. Действительно, обнаружено, что регулярно примерно половина семян после опыления не образует семян. Таким образом, в природе *Lamarckiana* в этом отношении постоянно гетерозиготна, обладая сбалансированной летальной системой. В такой системе обе летали убивают особь еще до образования семени, а именно в момент оплодотворения или вскоре после него, представляя собой зиготическую леталь (рис. 17-3).

Вспомним, что некоторые растения, в том числе и энотера, имеют гаплоидное гаметофитное поколение. Поэтому постоянная гетерозиготность может поддерживаться также и в том случае, если один из аллелей летален для мужского гаметофита, а другой — для женского (рис. 17-3). Следовательно, гаметофитные летали также могут дать сбалансированную летальную систему, препятствующую образованию семян половиной семян. Мы уже встречались с примером такого рода леталей в гене аутостерильности у табака (стр. 68). В общем, все встречающиеся в природе линии энотеры, включая и *biennis*, обладают вынужденной гетерозиготностью из-за зиготических и гаметофитных леталей, образующих сбалансированные летальные системы.

Объясняет ли существование сбалансированной летальной системы, почему, например, фенотип *Lamarckiana* оказывается единственным, который получается у потомства после самоопыления? Так как все изученные до сих пор раздельнополые организмы имеют много пар генов, то представляется невероятным, чтобы у энотеры была лишь одна пара рецессивно летальных генов, разнообразное (плейотропное) действие которых давало бы чистый фенотип. Более вероятно существование многих пар генов, образующих одну группу сцепления, так что все гены одного генома диплоидного организма сцеплены с одной рецессивной леталью, а все гены второго генома сцеплены с аллельной леталью.

Другими словами, *Lamarckiana* ведет себя так, как если бы она содержала два комплекса сцепленных генов. Внутри одной линии эти гены полностью сцеплены посредством какого-то механизма, предотвращающего рекомбинации, так что остаются гаметы лишь с двумя сортами генотипов. В природных популяциях данной линии эти два генных комплекса настолько устойчивы, что в случае *Lamarckiana* они получили названия *gaudens*

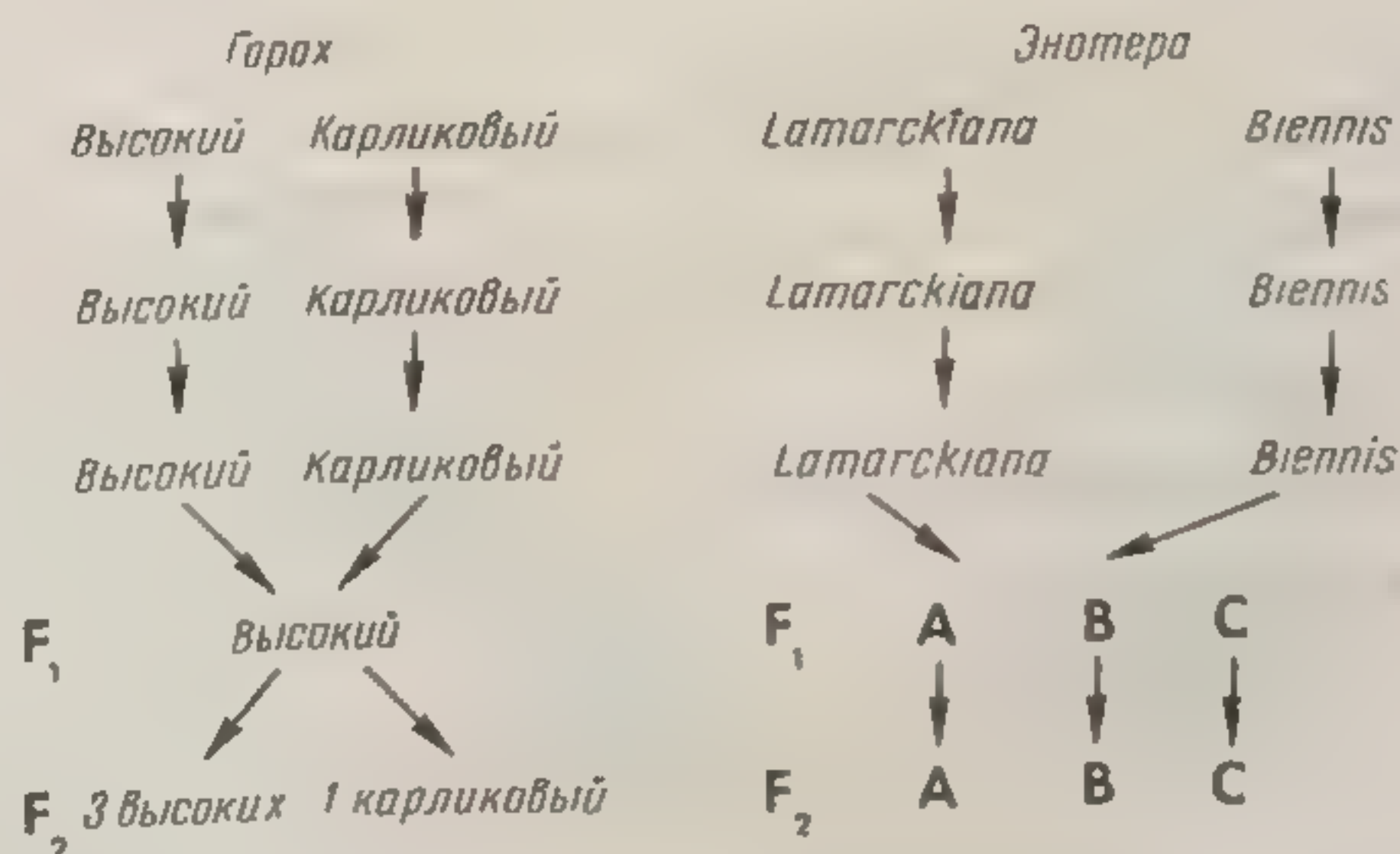


РИС. 17-2.

Сравнительные результаты разведения садового гороха и энотеры

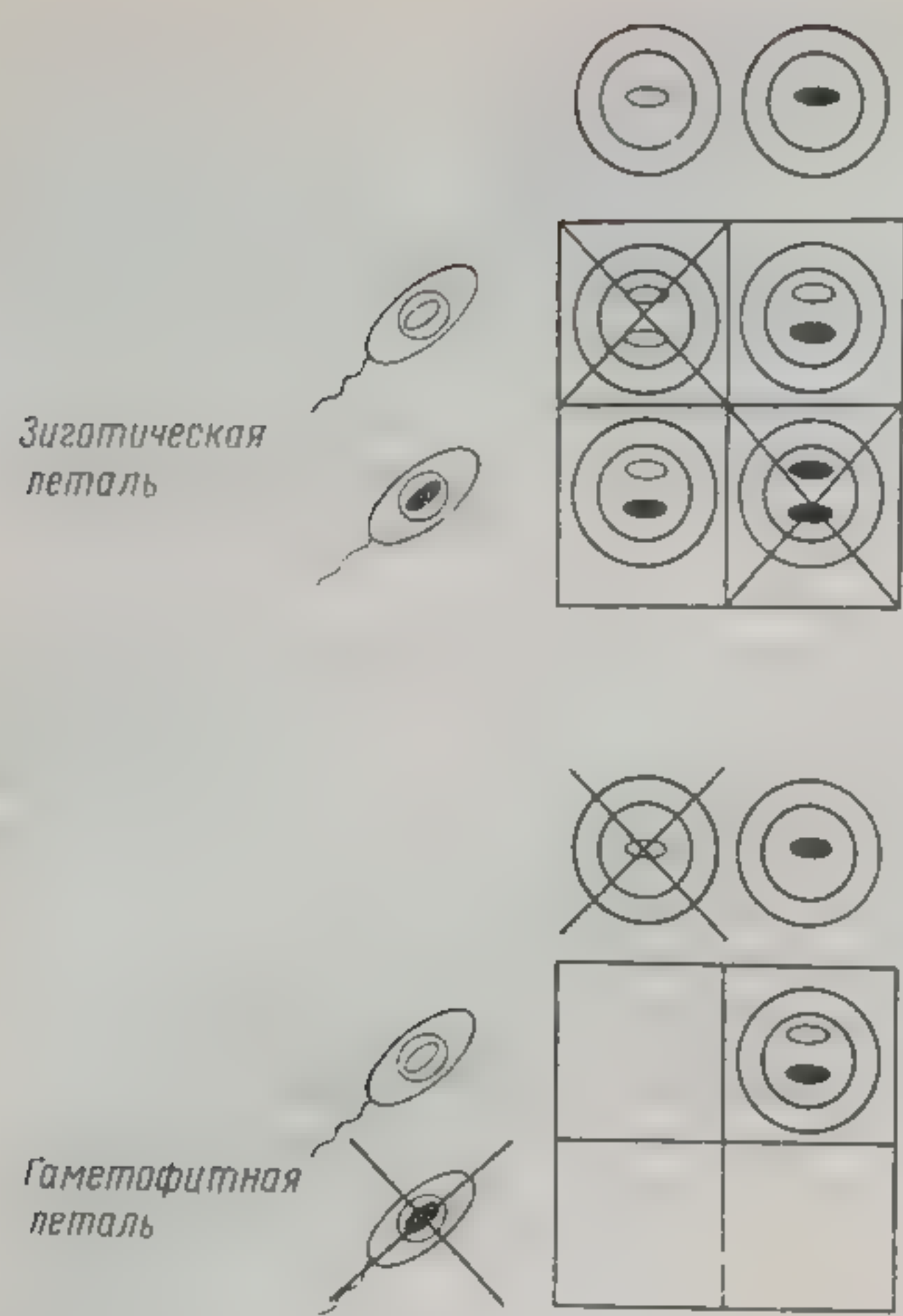


РИС. 17-3.
Системы сбалансированных леталей, поддерживающие состояние гетерозиготности

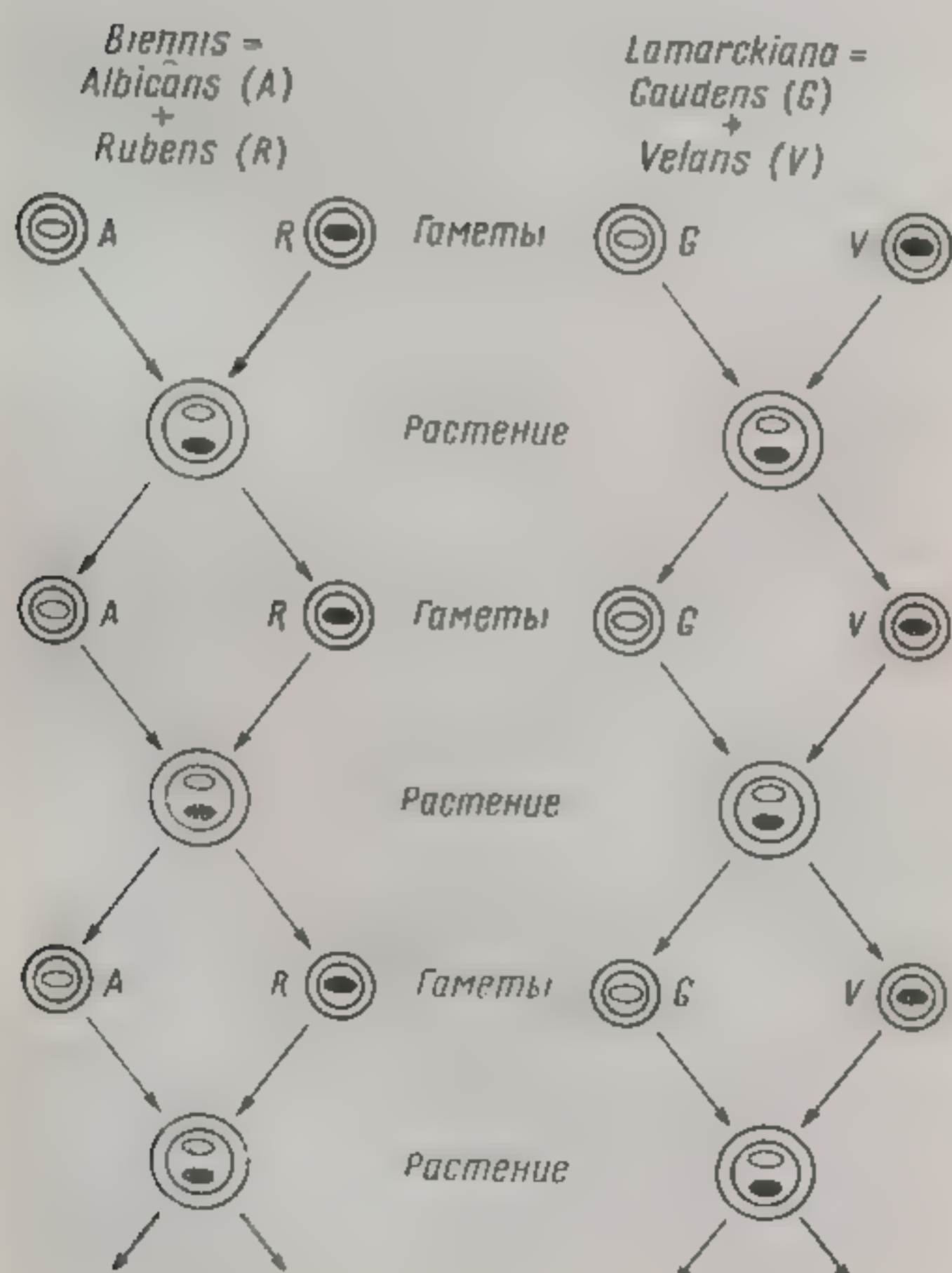


РИС. 17-4.
Комплексы сбалансированных летальных генов у *O. biennis* и *O. Lamarckiana*

и *velans*, и эта линия обозначается как *gaudens* × *velans*. Линия *biennis* описывается согласно ее генным комплексам как *albicans* × *rubens*. На рис. 17—4 показано, как эти сбалансированные летальные генные комплексы распределяются в ряду поколений у *biennis* и *Lamarckiana*. У любых двух линий не могут быть идентичными все рецессивно летальные аллели. Если бы это было так, то получающееся при их скрещивании потомство F_1 должно было бы состоять лишь из двух разных фенотипов, тогда как в действительности получают три разных фенотипа. Поэтому можно сделать вывод, что имеющаяся обычно у энотеры сбалансированная летальная система включает либо серии множественных аллелей, либо несколько пар генов

Каждый из трех разных гибридов F_1 , получающихся при скрещивании *Lamarckiana* и *biennis*, при самоопылении сохраняется. Следовательно, каждый гибрид содержит два комплекса полностью сцепленных генов. Однако из поведения при разведении других гибридов, полученных при межлинейных скрещиваниях, не обязательно следует такой же вывод. Такая амбивалентность показана на рис. 17—5, где слева приведены генные комплексы, имеющиеся у разных гибридов. Расположение различных генетических маркеров в гаметах этих гибридов (сверху на рис. 17—5) определено путем скрещиваний. Например, гибрид *curvans* × *velans* дает только два типа гамет, хотя и гетерозиготен по всем этим маркерным генам, и маркеры ведут себя так, как если бы они все были полностью сцеплены. С другой стороны, гибрид *flavens* × *velans* образует гаметы четырех типов. Гены *R*, *m* и *P*, которые все еще сцеплены друг с другом, расщепляются независимо от генов *B* и *Sr*, в свою очередь сцепленных между собой, так что половина гамет содержит одну из двух родительских комбинаций, а половина — одну из двух реком-

бинации сцепленных генов. Линия *biennis* описывается согласно ее генным комплексам как *albicans* × *rubens*. На рис. 17—4 показано, как эти сбалансированные летальные генные комплексы распределяются в ряду поколений у *biennis* и *Lamarckiana*. У любых двух линий не могут быть идентичными все рецессивно летальные аллели. Если бы это было так, то получающееся при их скрещивании потомство F_1 должно было бы состоять лишь из двух разных фенотипов, тогда как в действительности получают три разных фенотипа. Поэтому можно сделать вывод, что имеющаяся обычно у энотеры сбалансированная летальная система включает либо серии множественных аллелей, либо несколько пар генов

бинаций. Поэтому в данном случае гены, относящиеся к одной группе сцепления в родительских расах, при гаметогенезе гибрида ведут себя как две группы сцепления. Так как при гаметогенезе гибрида происходит 50% рекомбинаций, то эти результаты в действительности не объясняются предположением, что *flavens* (или *velans*) представляет собой отдельную группу сцепления, которая не может давать перекреста со вторым комплексом генов у родительской расы, но может давать перекрест, если ее партнером оказывается *velans* (или *flavens*).

Испытания гибрида, содержащего *flavens* × *curvans*, показали, что *m* и *P* у него все еще полностью сцеплены, но расщепляются уже независимо от *B*, который, в свою очередь, обнаруживает расщепление, независимое от *Sp* и *Cu*. Получается, что в этом случае существует три группы сцепления. Возможно, что при наличии дополнительных генетических маркеров удалось бы обнаружить больше групп сцепления. Однако в любом случае одна и та же гибридная комбинация всегда дает в гаметогенезе одни и те же группы сцепления.

Так как у некоторых межлинейных гибридов можно обнаружить по крайней мере три группы сцепления (даже если в самоопыляемой родительской линии все они и действуют как одна группа), то нужно ожидать наличия у диплоидной энотеры по крайней мере трех пар хромосом. Цитологические исследования подтверждают этот вывод генетики — все упомянутые в этой главе линии энотеры имеют по семь пар хромосом. (У *Oenothera gigas*, упомянутого на стр. 164 триплоида, 21 хромосома.) Если сбалансированная летальная система основывается на одной лишь паре генов, расположенных в единственной паре гомологичных хромосом, то у жизнеспособного потомства эта пара хромосом должна быть гетерозиготной. Но если другие шесть пар хромосом обнаруживают независимое расщепление, то они не должны обязательно быть гетерозиготными. Поэтому, например, все гаметы *O. biennis*, которые содержат комплекс рецессивных леталей *albicans*, с одинаковой вероятностью могли бы содержать гомолог *albicans* или *rubens* в каждом из других шести случаев независимого расщепления хромосом. Однако такого распределения не обнаружено. Мы могли бы предположить далее, что каждая из семи пар хромосом гетерозиготна по различным рецессивным леталем. С таким генотипом при самоопылении выжило бы лишь потомство F_1 , идентичное родительскому типу. Однако при этом в семена могло бы развиваться лишь $(1/2)^7$ всех семян; следовательно, такое объяснение не может быть правильным для энотеры, у которой, как уже отмечалось, около 50% семян образуют семена.

Загадка упорядоченного расщепления полных генных комплексов у энотеры может быть решена при цитологическом исследовании мейоза. Обычные самоопыляющиеся линии энотеры в природе не образуют, как ожидалось, семи отдельных бивалентов, но, как это четко видно в метафазе, образуют замкнутое кольцо из 14 хромосом, связанных «конец в конец» (рис. 17—6). Более того, в анафазе I хромосомы, соседние в кольце, расходятся к противоположным полюсам веретена, так что в начале процесса сегрегации хромосомы располагаются зигзагообразно (рис. 17—7). Если предположить, что в кольце отцовские и материнские хромосомы чередуются, то все отцовские

| | R | mP | B | Sp | Cu |
|---------------------------|---|----|---|----|----|
| <i>Flavens-curvans</i> | | | | | |
| <i>Flavens-percurvans</i> | | | | | |
| <i>Flavens-flectens</i> | | | | | |
| <i>Flavens-velans</i> | | | | | |
| <i>Rubens-flavens</i> | | | | | |
| <i>Rubens-curvans</i> | | | | | |
| <i>Curvans-velans</i> | | | | | |
| <i>Rubens-velans</i> | | | | | |

РИС. 17-5.

Группы сцепления у гибридов от межрасовых скрещиваний

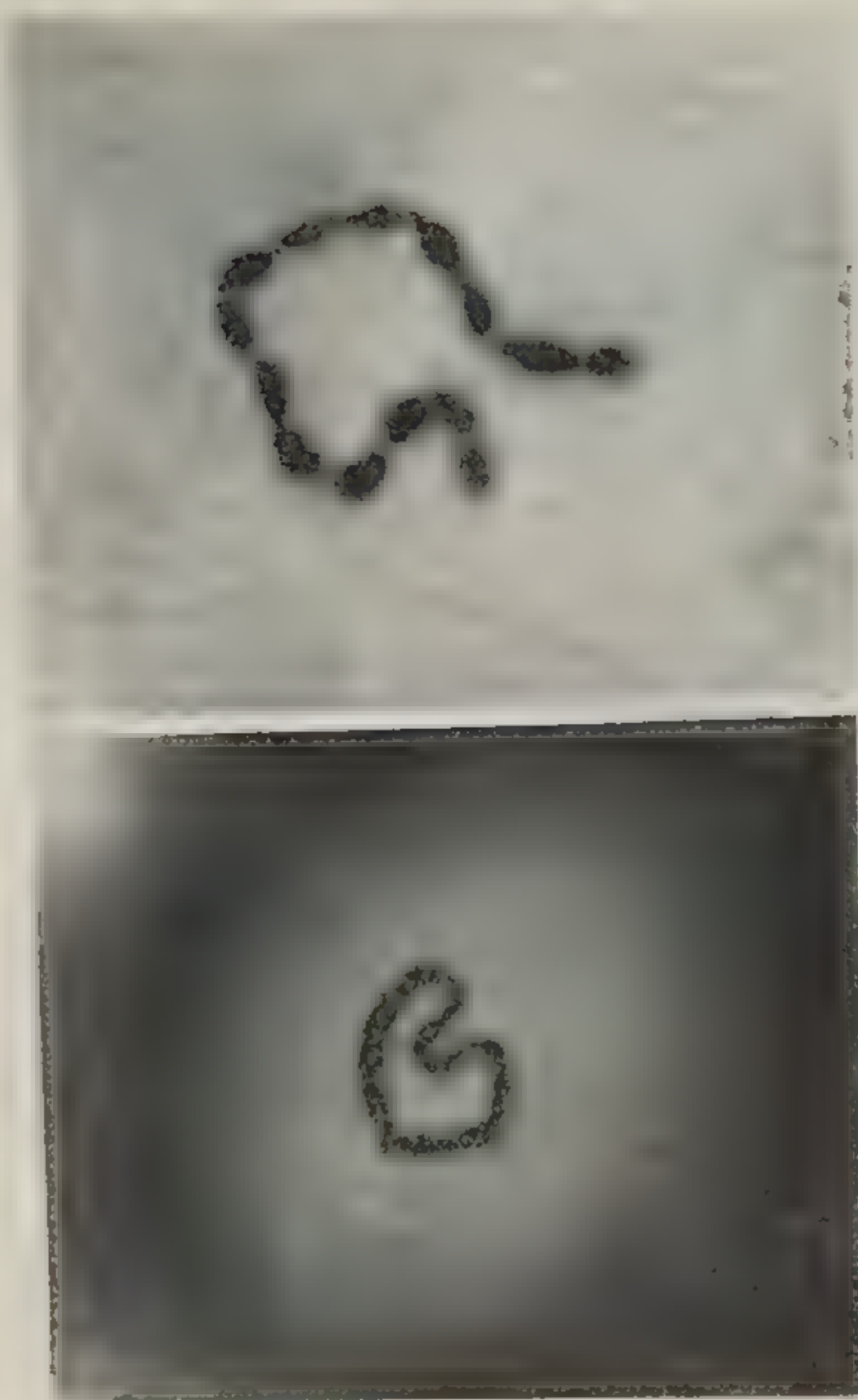


РИС. 17-6

Кольцо из 14 хромосом у энотеры. В верхней клетке, где кольцо разорвалось, в нем легко подсчитать число хромосом (R. Cleland)

в мейозе была всегда одна и та же. На рис. 17—7 у верхней клетки видно внутреннее кольцо из четырех и внешнее кольцо из десяти хромосом. Если предположение относительно чередующегося расхождения правильно, то отсюда должно следовать также, что такие группы сцепления должны сегрегировать независимо от других групп сцепления, включающих хромосомы других колец или отдельные пары, даже если четные (и, соответственно, нечетные) хромосомы кольца полностью сцеплены друг с другом. Правильность этого вывода можно проверить, сравнивая число определяемых генетически групп сцепления и наблюдаемое цитологически расположение хромосом в мейозе у разных гибридов, показанных на рис. 17—5. Такое сравнение позволяет понять, почему число наблюдаемых при мейозе отдельных групп хромосом никогда не бывает меньше числа групп сцепления, обнаруженных генетически. На самом же деле, если используется достаточное количество генетических маркеров, то число групп сцепления всегда равно числу групп хромосом.

Хотя все изложенное выше показывает, что довольно уникальное чередующееся расхождение хромосом кольца и наличие сбалансированных детальных систем могут объяснить большинство необычных генетических свойств энотеры, кое-что все же требует дополнительного объяснения. Во-первых, что заставляет эти хромосомы образовывать кольца? Ответ на этот вопрос содержится в результатах наблюдений, которые изложены на стр. 186 (см. также рис. 12—6), и сводится к тому, что две пары негомо-

хромосомы должны отойти к одному полюсу, а все материнские — к другому. Такое расщепление хромосом (если перекресты редки) позволяет объяснить как полное сцепление всех генов комплекса, так и тот факт, что образуемые растением гаметы идентичны тем, в результате слияния которых это растение получилось (рис. 17—8).

Если в процессе такого чередующегося расщепления разделяются отцовский и материнский геномы, то кольцо должно всегда содержать четное число хромосом. Более того, мы можем предсказать, что если генный комплекс не ведет себя более как одна группа сцепления, то он уже не будет образовывать общее кольцо из 14 хромосом с другим генным комплексом. Как показано на рис. 17—9, 14 хромосом можно расположить в кольца (содержащие четное число хромосом) и в пары 15 разными способами. Действительно, когда были получены гибриды между разными линиями, то в метафазах I у них были обнаружены все 15 типов хромосомных наборов и никаких других, причем у каждого из гибридов конфигурация хромосом

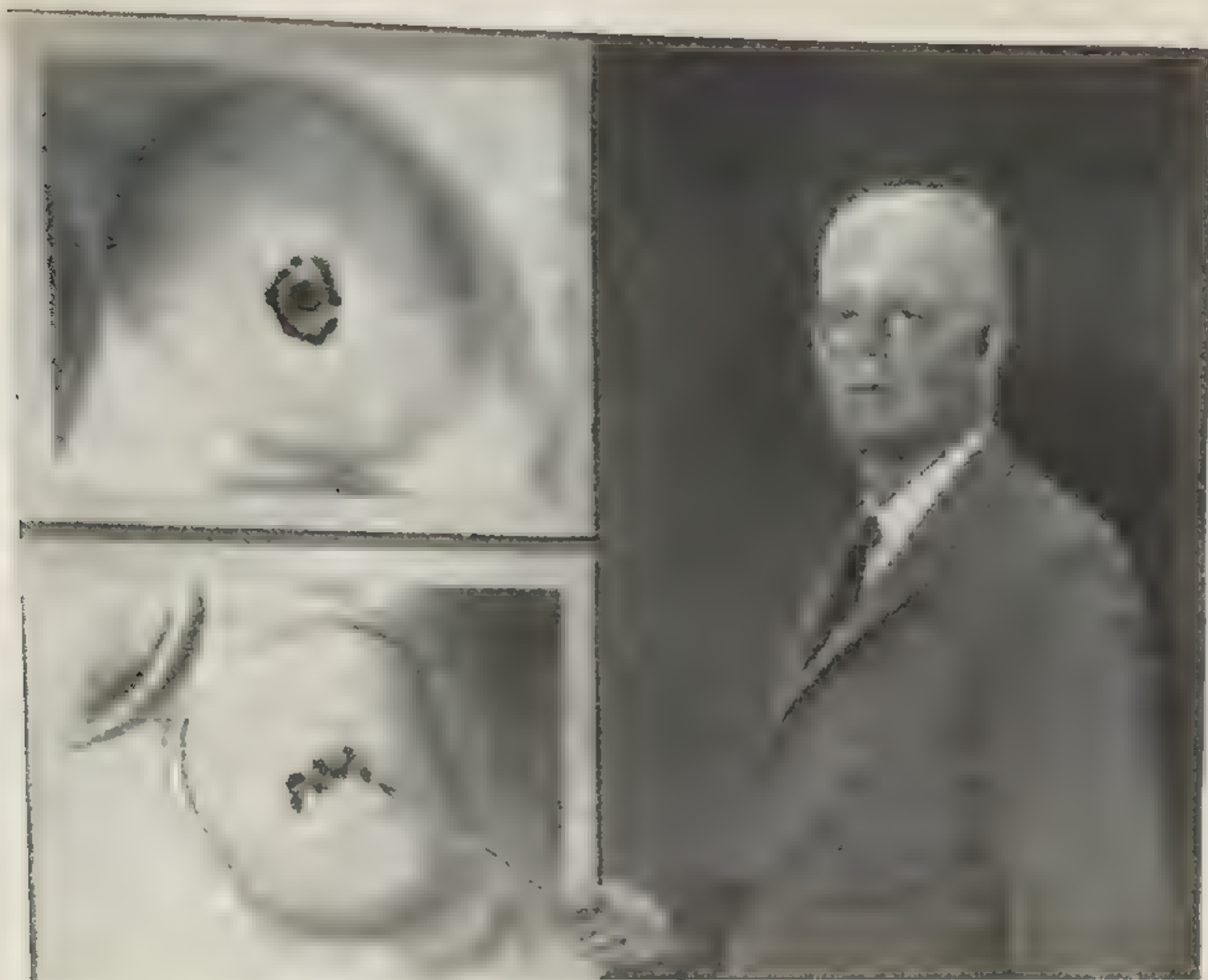


РИС. 17-7.
РАЛЬФ Е. КЛЕЛАНД
(1939 г.)

указывает на зигзагообразно расположенные хромосомы в начале анафазы I у энотеры; в метафазе I получится кольцо из 14 хромосом

логичных хромосом связаны во время синапсиса в виде двойной тетрады, если у них имеется реципрокная транслокация в гетерозиготном состоянии. У энотеры такая ситуация показана на рис. 17—10. Все хромосомы энотеры невелики, приблизительно одинаковы по размеру, и центромеры у них находятся посередине. Чтобы легче опознавать гомологичные хромосомы, концы разных хромосом в геноме обозначим разными цифрами. Допустим, что некогда между концами 2 и 3 (рис. 17—10, А, Б) произошла ауцентрическая реципрокная транслокация. В гетерозиготном состоянии (Б) эта перестройка приведет к Х-образной конфигурации во время конъюгации в профазе I (В) и к появлению кольца в метафазе I — ранней анафазе I (Г). Так, может возникнуть кольцо из четырех хромосом.

Если происходит вторая реципрокная транслокация между плечом любой хромосомы, входящей в кольцо из четырех хромосом, и плечом хромосомы, относящейся к какой-нибудь отдельной паре, то у организма, гетерозиготного по обеим реципрокным транслокациям, образуется кольцо из шести хромосом. Это показано на рис. 17—10, Г, Д. В случае Г приведена конфигурация до того, как произошел обмен плечами 4 и 5; в Д показано кольцо из шести хромосом, получающееся в мейозе после такого обмена. При последующих обменах такого типа могут получаться еще большие кольца. Для образования кольца из 14 хромосом требуется шесть таких обменов. Наличие реципрокных транслокаций в гетерозиготном состоянии позволяет объяснить, как у энотеры получают кольца разной величины, содержащие четное число хромосом.

Итак, теперь известны некоторые детали цитологического анализа энотеры, однако картина еще не полная. Один из оставшихся вопросов: каков механизм, обеспечивающий при мейозе отход к одному полюсу

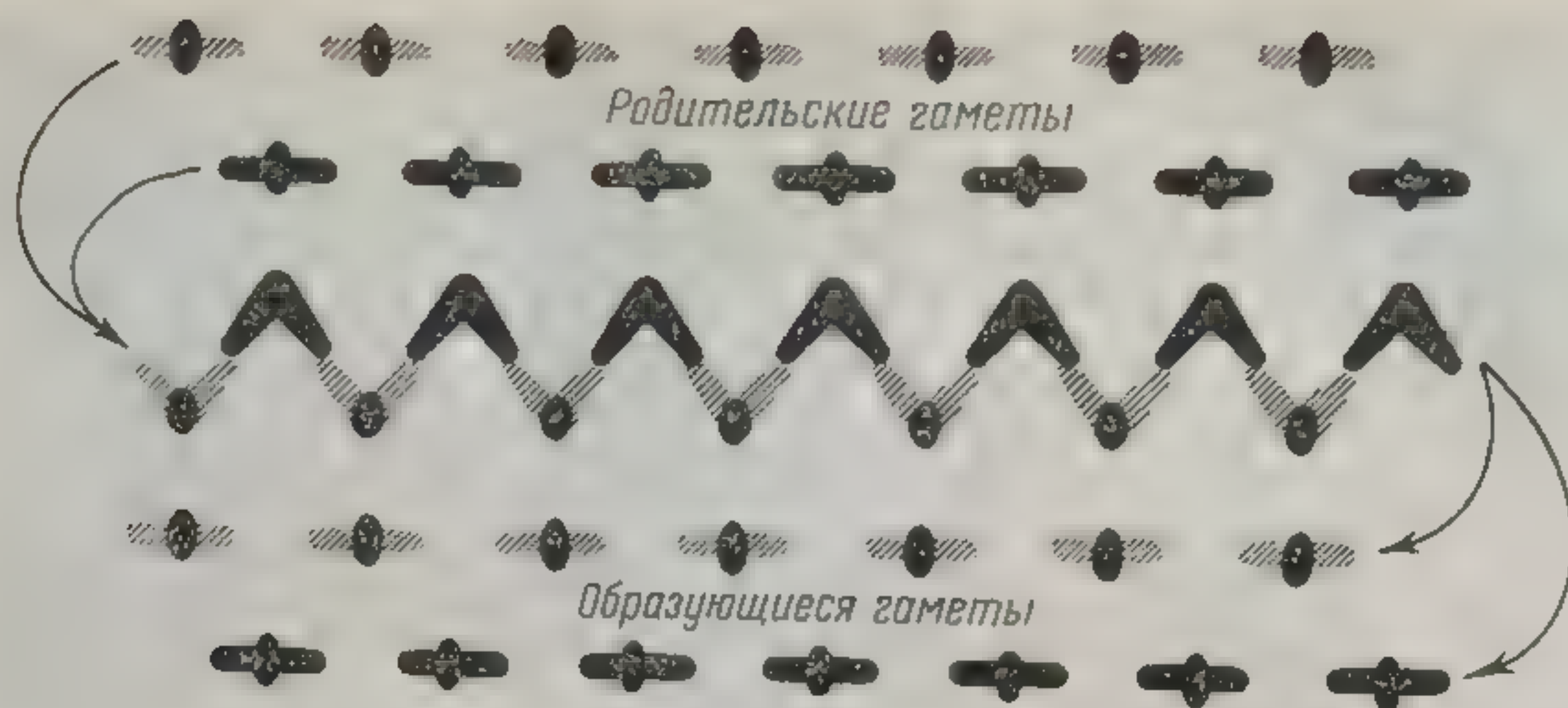


РИС. 17-8.

Способ расщепления хромосом при мейозе у энотеры

хромосом, расположенных в кольце через одну? Пока на этот вопрос нельзя дать полностью приемлемого ответа. Другой вопрос возникает в связи с тем, что почти все различные встречающиеся в природе линии энотеры образуют кольца из 14 хромосом. Все ли шесть транслокаций, нужных для образования такого кольца, одинаковы у всех рас? Нет; ведь тогда жизнеспособные межлинейные гибриды образовывали бы в мейозе либо кольца из 14 хромосом, либо семь отдельных пар. Тот факт, что у таких гибридов в мейозе обнаружены все конфигурации, приведенные на рис. 17—9, означает, что специфические транслокации в плечах хромосом у разных генных комплексов отличаются друг от друга. Существует много тысяч способов разделения 14 концов на семь групп по два. Как определить, сколько их имеется в природе?

Мы можем начать с того, что выберем какой-то определенный генный комплекс — назовем его «эталонным» — и пометим концы его хромосом 1—2, 3—4, 5—6, 7—8, 9—10, 11—12, 13—14. Обычно, т. е. в природе, этот генный комплекс образует кольцо из 14 хромосом с другим генным комплексом, у которого, следовательно, нет хромосом с такой же парой концов, что и у хромосом эталонного комплекса. Далее мы образуем серию межлинейных гибридов, используя в качестве одного из комплексов эталон, и отмечаем у этих гибридов конфигурации хромосом в мейозе. Пусть у одного из гибридов образуется пять пар и кольцо из четырех хромосом. Это должно означать, что у испытуемого комплекса на концах пяти хромосом порядок тот же, что и у хромосом эталона, а в остальных двух хромосомах другой порядок. До сих пор не было причин приписывать концы

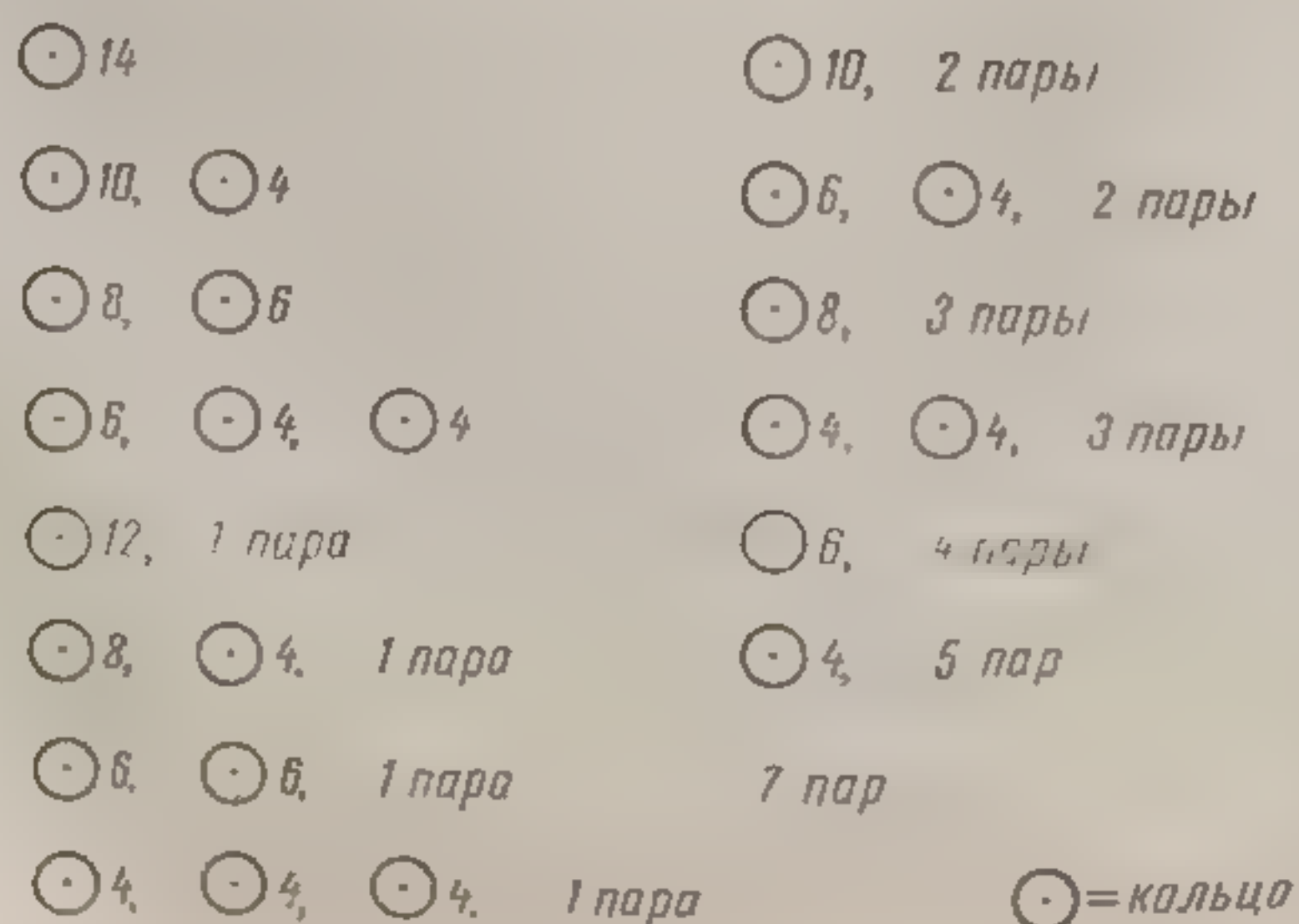


РИС. 17-9

Возможные случаи рас-
пределения хромосом
энотеры по кольцам и па-
рам

1—2 и 3—4 эталонного комплекса какой-либо определенной хромосоме. Теперь мы можем произвольно приписать эти концы двум эталонным хромосомам, входящим в состав кольца из четырех хромосом. Тогда входящие в кольцо хромосомы исследуемого комплекса могут быть названы 2—3 и 4—1 (или 2—4, 1—3). Таким образом, навсегда установлен состав концов двух пар хромосом. Сверху на рис. 17—11 показаны эталонный и исследуемый комплексы (из нашего примера), находящиеся в состоянии синапса в соответствии с номерами концов.

Назовем уже испытанный комплекс А. Допустим, что образованы гибриды другого комплекса Б с эталоном и комплексом А. Из конфигурации хромосом гибрида в мейозе можно определить другие концы А, Б и эталона. Эти операции можно проводить до тех пор, пока не будут определены все хромосомы эталона, а также полный порядок всех 14 концов для любого другого комплекса. Таким методом можно показать, что в природе кольцо из 14 хромосом могло быть получено многими разными способами. В центре и внизу на рис. 17—11 приведены гипотетический и действительный случаи. Было проанализировано 350 комплексов и было обнаружено более 160 различных расположений сегментов. Все эти результаты согласуются с гипотезой, согласно которой в течение эволюции концы хромосом энотеры много раз и различными способами перемещивались путем реципрокных транслокаций. Наконец, наиболее убедительная проверка правильности привлечения для объяснения реципрокных транслокаций — это возможность предсказать ту мейотическую конфигурацию хромосом, которая должна быть обнаружена у еще неполученного гибрида. Эта возможность была многократно использована, и всегда обнаруживалась предсказанная конфигурация.

На разных этапах обсуждения материала этой главы казалось, что поведение энотеры представляет собой нечто исключительное, явно нарушающее наши представления о чистых линиях и независимом расщеплении. Однако более тщательное изучение показало, что неожиданные особенности в поведении энотеры вызваны другими, уже известными нам генетическими событиями. Энотера представляет собой исключение, которое следует высоко ценить. Точное соответствие необычной генетики энотеры ее необычной цитологии показывает правильность хромосомной теории в трансмиссионной генетике.

При многих обстоятельствах три особенности цитогенетики энотеры, — реципрокные транслокации, рецессивные летали и самоопыление, — невыгодны. Однако жизнеспособность энотеры, вероятно, оказывается выше, чем при сочетании всех этих трех недостатков в одном растении. Механизм самоопыления включает перемещение рыльца пестика вниз до уровня пыльника, так что в результате опыления получается обильнее, чем при опылении растения насекомыми. Такой механизм самоопыления возмещает 50%-ную смертность, вызванную сбалансированными летальными. Эти летали вместе с реципрокными транслокациями и чередующимся рас-

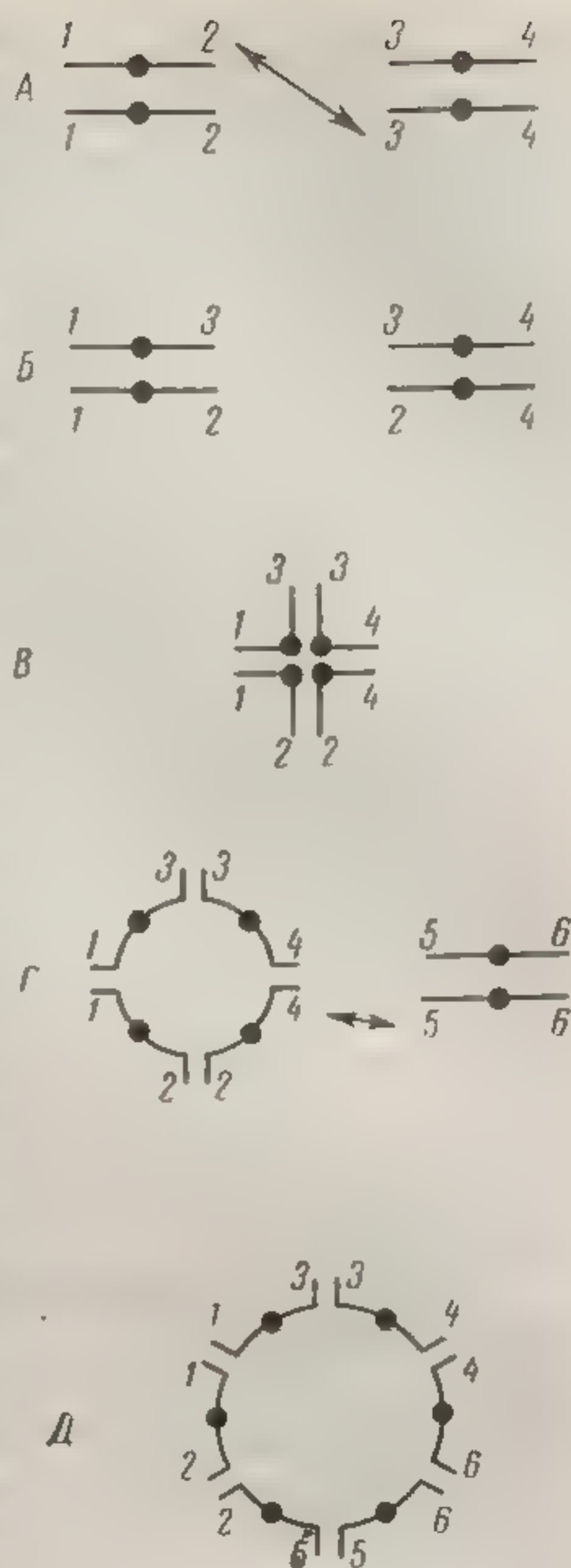


рис. 17-10.

Гетерозиготные реципрокные транслокации и образование кольца. Хроматиды не показаны

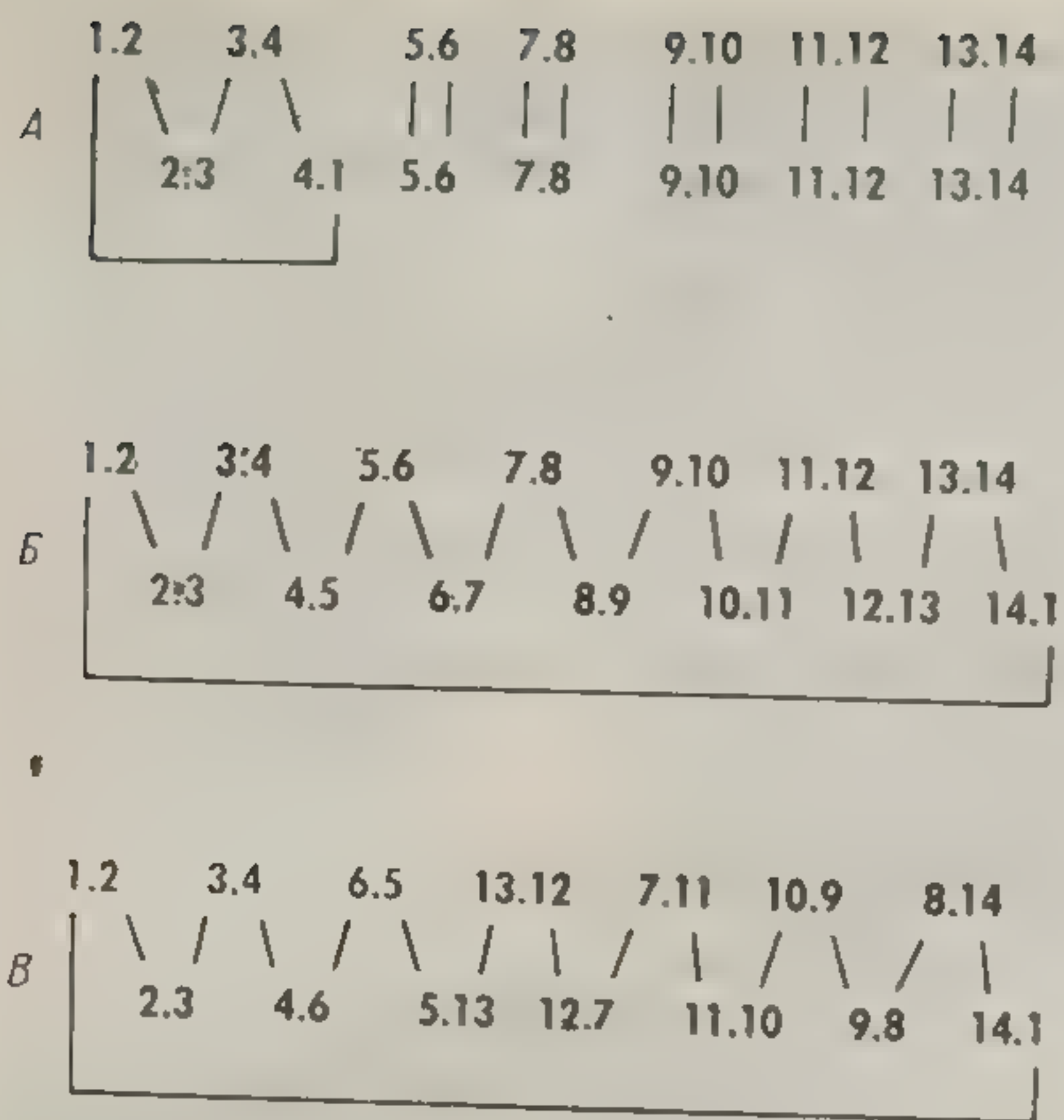


РИС. 17-11.

Классификация концов хромосом в различных комплексах энотеры

А — комплексы, различающиеся по одной реципрокной транслокации; Б — комплексы, различающиеся шестью реципрокными транслокациями; В — действительный состав кольца из 14 хромосом расы *Mugicata*. Примеры А и В — гипотетические

щеплением препятствуют гомозиготности, которая получается обычно при самооплодотворении, усиливают гетерозиготность и дают максимум гибридной силы.

На высокую жизнеспособность энотеры указывает широкое распространение этого рода: его представителей можно найти на пространствах от южной оконечности Южной Америки до дальних пределов Северной Канады и от Атлантического океана до Тихого. Интересно отметить, что у наиболее многочисленных и занимающих наибольшие территории линий этого рода обнаружены большие кольца, сбалансированные летали и самоопыление.

ДРОЗОФИЛА

Реципрокные транслокации играли важную роль в эволюции энотеры. Но можно возразить, что этот род представляет собой нетипичный пример значения хромосомных перестроек в эволюции, так как его цитогенетические свойства весьма необычны. В природе встречаются сотни разных видов дрозофил. Можно провести сравнение их экологии, морфологии, физиологии и биохимии. Для тех видов, которые способны скрещиваться между собой, можно сравнить также и рекомбинационные генетические свойства. Можно сопоставить также морфологию хромосом слюнных желез и вид хромосом в метафазе у разных видов. И если учесть всю доступную информацию такого типа, то можно расположить хромосомы разных видов на схеме так, чтобы соседние по схеме были наиболее тесно связаны по происхождению, эволюционно (С. Metz и др.). Такая схема приведена на рис. 17—12, где показаны *кариотипы* — гаплоидные наборы метафазных хромосом (включая X-, но не Y-хромосомы) для разных видов или групп видов дрозофилы. Например, в строке 2 (колонка 1) приведен кариотип видов группы *melanogaster*. Нижняя хромосома представляет собой палочкообразную X-хромосому, две V-образные хромосомы — это две большие аутосомы (II и III), а пятно — это крошечная хромосома IV. Те целые хромосомы или плечи, которые считаются гомологичными этим четырем, расположены в других кариотипах в соответствующих местах. Что можно извлечь из сравнения всех этих кариотипов?

Так как метафазные хромосомы характеризуются в основном размером и формой, то нельзя ожидать, чтобы на этом этапе удалось различить

какие-либо небольшие перестройки. Поэтому на схеме не удастся обнаружить небольшие перестройки, в том числе дупликации, нехватки, сдвиги, транспозиции, инверсии, транслокации, независимо от того, существенны ли они. В метафазе не обнаруживаются даже большие парацентрические инверсии, так как они не изменяют формы хромосом. Однако другие большие структурные изменения увидеть можно. Хромосомы в колонках 2 и 3 строки 4 представляются идентичными, за исключением того, что парацентрическая инверсия изменила палочковидную хромосому на V-образную, или наоборот. (Парацентрические инверсии всегда изменяют относительные длины плеч, если два разрыва произошли на разных расстояниях от центромера.) Сравним кариотип *melanogaster* (строка 2, столбец 1) с кариотипом справа от него (строка 2, столбец 2). V-образная аутосома *melanogaster* появляется у эволюционно близкого вида как две палочки. Отметим также исчезновение самой маленькой хромосомы. В следующем кариотипе справа (строка 2, столбец 3) две палочки соединились, образовав V, которая отлична от обеих V-образных хромосом *melanogaster*.

В этой схеме есть и другие примеры того, что две палочковидные хромосомы могут образовывать V-образную хромосому, или наоборот, V может образовывать две палочки. Посмотрим сначала, как из двух палочек может получиться V (рис. 17—13). Вспомним, что обычно палочкообразная хромосома имеет два плеча, но одно из них очень короткое. Короткое плечо может быть неразличимо в метафазе или анафазе. Однако его существование можно показать цитологически на той или иной стадии ядерного цикла, а также генетически, изучая рекомбинации. Пусть две палочки разорваны вблизи их центромеров так, что в одной хромосоме разрыв произошел в длинном плече, а в другой — в коротком плече. Если длинное ацентрическое плечо первой хромосомы соединится с длинным же центрическим фрагментом второй, то получится V-образная хромосома. Отметим, что здесь происходит соединение двух целых плеч при эуцентрической полутранслокации. Остальные фрагменты могут соединиться друг с другом, образуя маленькую эуцентрическую хромосому и завершая таким образом реципрокную транслокацию, а могут и остаться несоединившимися. В любом случае отсутствие этих участков может физиологически не ска-

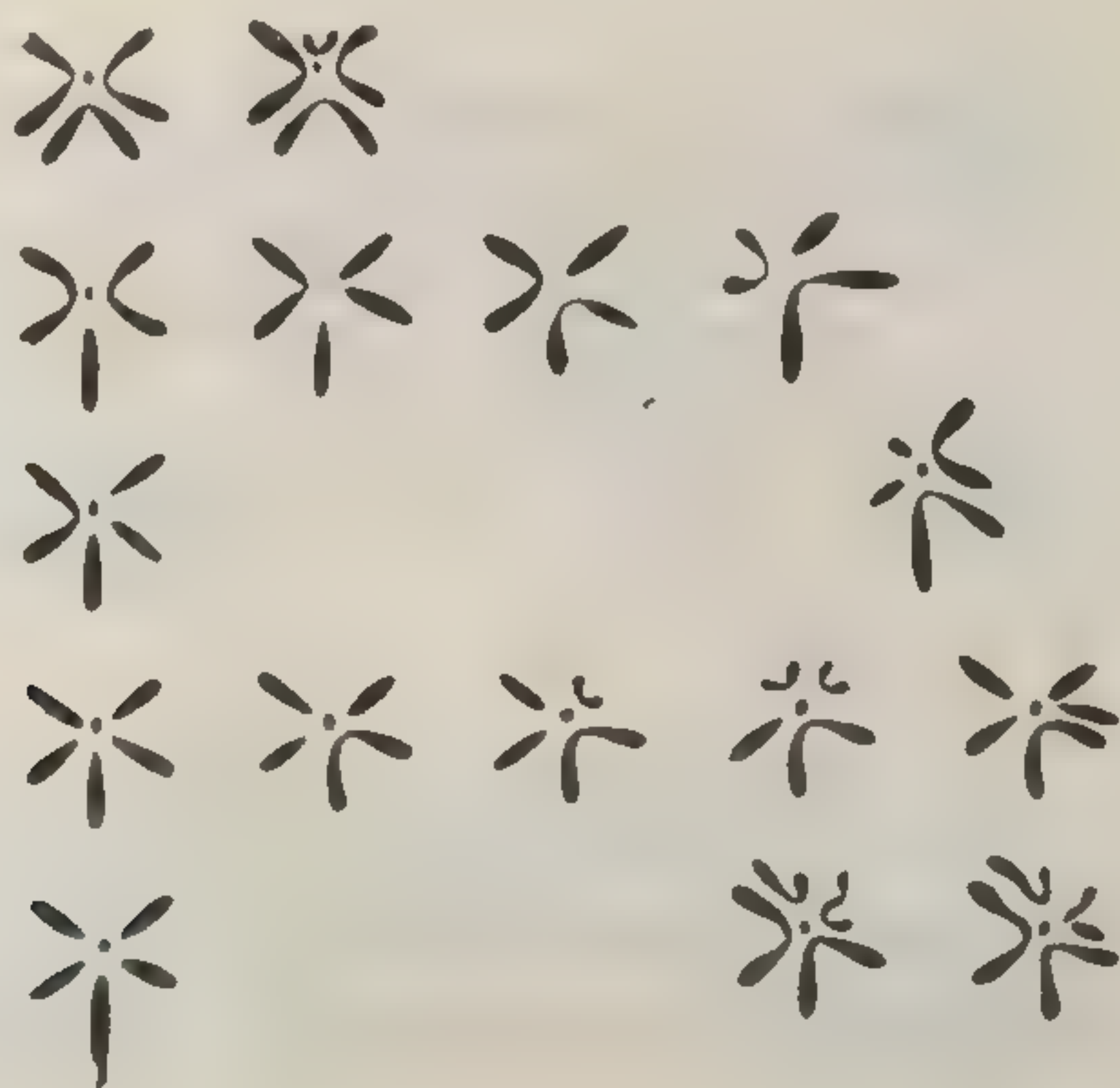


РИС. 17-12.

Конфигурации хромосом
у некоторых видов дро-
зофилы

заться, если короткие фрагменты утрачиваются при последующем делении ядра, а количество утраченных с ними генов достаточно мало.

Обратный процесс образования двух палочек из V-образной хромосомы требует участия центромера какой-либо другой хромосомы. У дрозофилы такой второй хромосомой может быть Y (рис. 17—14). Пусть V-образная хромосома разорвана вблизи центромера, а Y-хромосома — где угодно. Если после этого происходит эуцентрическая реципрокная транслокация, то возникнет две хромосомы, у каждой из которых одно из плеч унаследовано почти целиком от Y-хромосомы. Если вслед за этим происходят парацентрические делеции в этих плечах, содержащих фрагменты Y-хромосомы, то в результате хромосомы приобретают вид палочек. При этом завершается превращение одной V-образной хромосомы в две палочковидные! Заметьте, что при этом утрачивается почти вся Y-хромосома за исключением центромера. Но эта утрата не сказывается на жизнеспособности дрозофилы или сказывается лишь незначительно, так как Y-хромосома содержит сравнительно мало локусов, которые к тому же определяют в основном подвижность спермиев. Такая серия мутаций может начаться, например, в половых клетках самца и привести к появлению двух хромосом, каждая из которых содержит часть Y-хромосомы. Делеция фрагментов Y-хромосомы может произойти без ущерба, если эти хромосомы находятся в половых клетках самки. Если же в свое время к генотипу добавилась лишняя нормальная Y-хромосома, то этот процесс может проходить и в половых клетках самца. Центромер, необходимый для превращения V-образной хромосомы в две палочки в результате такого же или подобного ряда мутаций, может быть получен у *melanogaster* также и от малой хромосомы IV, моносомия по которой не летальна ни для самцов, ни для самок.

Сравнение кариотипов дрозофилы подтверждает предположение (глава 12) о том, что транслокации целого плеча могут сохраняться в естественных популяциях. Такие перестройки и перицентрические инверсии очень полезны для исследователей, так как они помогают установить эволюционные связи между разными видами. Следует, однако, подчеркнуть, что сама по себе информация такого типа еще не доказывает правильности ни одного из приведенных ниже положений:

1. Образование разных видов есть прямое следствие возникновения таких перестроек;



РИС. 17-13.

Образование V-образной хромосомы из двух палочковидных



РИС. 17-14.

Образование двух палочковидных хромосом из V-образной хромосомы и Y-хромосомы



ГУГО ДЕ ФРИЗ
(1848—1935),
первый исследователь
мутаций и генетики энотеры

2. Эти перестройки имеют второстепенное значение для видообразования;

3. Такие мутации возникают после того, как закончилось образование вида.

На примерах энотеры и дрозофилы мы видели, что большие хромосомные перестройки разных типов продолжают во время эволюции разных групп организмов. Поэтому, по-видимому, благоразумно воздержаться здесь от предсказания того, какие именно структурные изменения могут быть связаны с эволюцией других групп организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя в цитогенетике энотеры есть несколько необычных черт, современные знания позволяют понять их природу. Поэтому энотера представляет собой замечательное подтверждение хромосомной природы генетического материала. У этого рода эволюция тесно связана с самоопылением, сбалансированными летальными и многочисленными реципрокными транслокациями.

В эволюции дрозофилы часто происходили перичентрические инверсии (изменяющие вид хромосомы) и реципрокные транслокации целого плеча (приводящие к изменению числа хромосом).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

17.1. Как можно обосновать утверждение, согласно которому гены, образующие сбалансированную летальную систему у *Lamarckiana*, отличаются от генов, образующих такую систему у *biennis*?

17.2. Обсудите утверждение: «Все энотера, встречающиеся в природе, представляют собой постоянные гибриды».

17.3. Чем возникновение кольца хромосом отличается от образования кольцевой хромосомы?

- 17.4. Может ли кольцо содержать нечетное число хромосом? Объясните.
- 17.5. Какие новые исследования по генетике, а также по цитологии энотеры подсказала Вам эта глава?
- 17.6. Перечислите генетические законы, которые можно бы было вывести, если бы энотера была единственным изученным до сих пор организмом.
- 17.7. Как Вы думаете, зачем была написана эта глава, если в ней не содержится новых законов генетики?
- 17.8. Дрозофилы с загнутыми крыльями при скрещивании друг с другом дают некоторое количество потомков с незагнутыми крыльями. При скрещивании друг с другом, мухи с глазами цвета сливы всегда образуют немного потомства без этого признака. Но когда скрещиваются между собой мухи, у которых одновременно загнуты крылья и глаза сливового цвета, то в потомстве встречаются лишь мухи такого же типа. Объясните все три результата.
- 17.9. а) Нарисуйте схему, показывающую гетерозиготную транслокацию целого плеча во время конъюгации у дрозофилы. Перенумеруйте все плечи хромосом.
- б) Что еще необходимо для того, чтобы при скрещивании двух мух с такой конституцией в потомстве появлялись лишь мухи такого же типа?
- 17.10. Дает ли вынужденная гетерозиготность у энотеры адаптивное преимущество? А у других организмов?
- 17.11. Обсудите эволюционную пластичность родов *Oenothera* и *Drosophila*.
- 17.12. Входит ли сбалансированная летальная система у энотеры в ее генетический груз? Объясните. Если это так, то входят ли летали в сбалансированный груз или в груз мутаций? Объясните.
- 17.13. Сравните генетическое действие ионизирующего излучения на популяции энотеры и дрозофилы.
- 17.14. Объясните, каким образом зигота дрозофилы, образованная спермием, содержащим центрическую Y-хромосому с огромной делецией, может развиваться в плодовитого самца.

ЛИТЕРАТУРА

- R. E. Cleland. A Case History of Evolution.— Proc. Indiana Acad. Sci. (1959), 1960, 69, 51.
- R. E. Cleland. The Cytogenetics of *Oenothera*.— Advances Genetics, 1962, 11, 147.
- J. T. Patterson, W. S. Stone. Evolution in the Genus *Drosophila*. N. Y., 1952.
- M. J. D. White. Cytogenetics of the Grasshopper *Moraba scurra*. VIII.— Chromosoma, 1963, 14, 140.

У пер
гетеро
дится
т. е. с
при до
крестн
ными,
му так
чистым

Хот
зательн
в Южно
ны, (ii),
наприм
ной по
рики, н
ляции,
дящиеся
и типам
удобно с
фонда о

РАСЫ

Если оп
только г
содержа
Согласно
расы — п
нофонде).

С друг
частот i и
делена для
ной Евро
генофонда
продвижен
Азии и в
уменьшает
ты этого
делить чел
на, будет

Поэтом
ства. Для
расы; в др
шинство ав
гут увелич
между по

17 и. Гершков

РАСЫ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ВИДОВ

У перекрестно-оплодотворяющихся видов разные особи в популяции гетерозиготны по разным генам (см. главу 16), даже если генофонд находится в равновесии с факторами, вызывающими изменение частоты генов, т. е. с мутированием, отбором, дрейфом и миграцией. Иными словами, при достижении генетического равновесия не обязательно все члены перекрестно-оплодотворяющейся популяции должны становиться гомозиготными, так же как и не все они должны оказаться гетерозиготными. Поэтому такие популяции с течением времени не становятся ни генетически чистыми, ни однородными.

Хотя любая популяция полиморфна по некоторым генам, она не обязательно полиморфна по каждому гену. Например, почти все индейцы в Южной Америке имеют группу крови O и в этом отношении они гомозиготны, (ii), но по другим генам они полиморфны. Кроме того, некий аллель, например U^B , может редко встречаться или даже совсем отсутствовать в одной популяции, как это имеет место у некоторых индейцев Северной Америки, но быть относительно распространенным в генофонде другой популяции, что и происходит в Центральной Азии. Итак, популяции, находящиеся в разных частях земного шара, могут отличаться друг от друга и типами аллелей, и их частотами в генофонде. По многим причинам удобно обозначить популяцию с определенными характеристиками генофонда одним словом — *раса*.

РАСЫ

Если определять границы расы в соответствии с распределением одного только гена U^B для групп крови ABO , то следует отнести популяции, содержащие и не содержащие в своем генофонде U^B , к разным расам. Согласно этому критерию, существовало бы только две человеческих расы — индейцы Южной Америки (без U^B) и все остальные люди (с U^B в генофонде).

С другой стороны, можно различать расы на основании относительных частот i и U^B в популяциях. Частота этих аллелей в генофонде была определена для многих популяций на всем земном шаре. Оказалось, что в Западной Европе, Исландии, Ирландии и частично в Испании три четверти генофонда составляет i , причем частота этого гена уменьшается по мере продвижения на восток. С другой стороны, U^B превалирует в Центральной Азии и в некоторых популяциях Индии; его частота, однако, постепенно уменьшается, по мере удаления от этих районов. Так как изменение частоты этого аллеля происходит постепенно, то любая попытка четко разделить человечество на расы, обладающие разными частотами этого гена, будет произвольной.

Поэтому на практике число различаемых рас остается вопросом удобства. Для некоторых целей достаточно разделить человечество лишь на две расы; в других случаях различают до 200 разных рас. Как правило, большинство антропологов различает около полудюжины основных рас, но могут увеличивать их число примерно до 30, учитывая более тонкие различия между популяциями. Однако, независимо от числа различаемых рас,

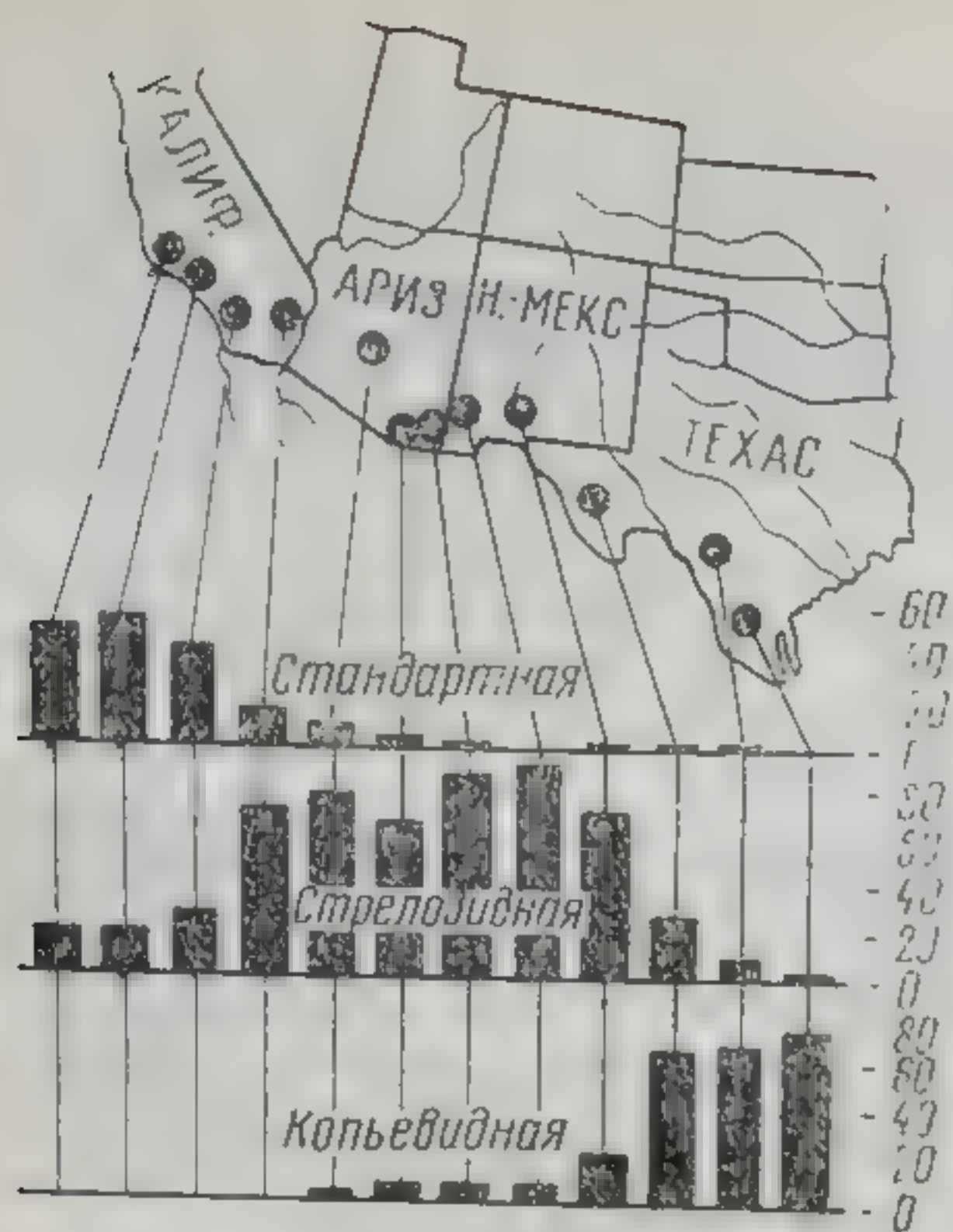


РИС. 18-1.

Распределение типов инверсий у *D. pseudoobscura*, отловленных на юго-западе США. Шкала—% хромосом (по Ф. Добжанскому и К. Эплингу)

каждая из них лучше всего характеризуется имеющимися у нее генами. Люди в популяции имеют одну из четырех групп крови,— *A*, *B*, *AB* или *O*, промежуточные группы крови исключены, поэтому не существует ни среднего генотипа для группы крови *ABO*, ни среднего генотипа для любого другого полиморфного гена. Так как в популяции нет среднего генотипа, то расу следовало бы характеризовать относительной частотой аллелей, содержащихся в ее генофонде. Так как нет среднего генотипа, то у расы не может быть и среднего фенотипа. Соответственно, нельзя обрисовать и типичного (среднего) представителя какой-либо расы.

При определении рас полезны и другие особенности крови, кроме групп *ABO*, генетическая основа которых известна. Вообще уместно использовать здесь любое фенотипическое различие, вызванное различием генетическим. При разграничении рас можно исходить из некоторых генетических различий в окраске волос, кожи, цвете глаз, а также из различий в телосложении и форме головы. Следует избегать использования таких фенотипических различий, для которых не доказана генетическая основа, так как среда сама по себе тоже может вызывать различия фенотипов (глава 4). Вспомним также, что разные генотипы из-за взаимодействия генов при доминантности и эпистазе могут давать одинаковые фенотипы (глава 4).

Знание характера распределения генов группы крови *ABO* в разных популяциях существенно для генетиков, антропологов и ученых других специальностей. Чем могут обуславливаться различия в подобном распределении? При браке люди не считаются с группами *ABO* крови; нет оснований считать, что эти гены обладают каким-либо плеiotропным эффектом, делая людей с одной группой крови сексуально более привлекательными, чем людей с другими группами крови. Поэтому скорее всего браки случайны в отношении к генотипу *ABO*. Но согласно некоторым данным, разные генотипы *ABO* имеют разную биологическую приспособленность. Часть различий в распределении генов может объясняться также разными частотами мутирования. За последние несколько тысяч лет наибольшие изменения в частотах генов *ABO* в разных популяциях произошли, вероятно, в результате генетического дрейфа и миграции. Удастся даже восстановить пути происходивших в прошлом переселений, используя— вместе с другими данными — постепенные изменения в частоте генов *ABO* и других групп крови в соседних популяциях.

Уже отмечалось (стр. 226), что в природных популяциях *D. pseudoobscura* обнаружены различные парацентрические инверсии. Все эти мухи фенотипически весьма схожи, хотя их хромосомы внешне различаются.

Для определения относительных частот этих инверсий Ф. Добжанский и его сотрудники исследовали выборочные популяции этой мухи на юго-западе Соединенных Штатов (рис. 18—1). Оказалось, что популяции Калифорнии богаты инверсиями, названными «стандартной» и «клиновидной». Популяции, обитающие западнее, в Аризоне и Нью-Мексико, содержат довольно мало «стандартных» и «копьевидных» хромосом; большинство хромосом у них имеют «клиновидную» перестройку. Наконец, еще далее на запад, в Техасе, почти не обнаружено «стандартных» и имеется мало «клиновидных» хромосом, а большинство хромосом относится к «копьевидным».

Подобные различия в частоте и типе инверсий в трех разных географических районах нельзя считать результатом избирательного мутирования, так как скорость спонтанного возникновения инверсий крайне низка. Более того, ничто не указывает на существенные изменения в недавнем прошлом распространенности в этих популяциях генов, внесенных извне при скрещиваниях; следовательно, скорости миграции, вероятно, довольно слабо влияли на частоты генотипов. Нет также указаний и на то, что различия в частоте инверсий в этих трех районах вызваны генетическим дрейфом. Эти наблюдения приводят нас к предположению о том, что основная причина таких различий между популяциями заключается в разной адаптивной ценности особей с разными типами инверсий в разных географических областях. Лабораторные исследования показали, что эти инверсии, не оказывая какого-либо явного влияния на строение тела, обладают различными физиологическими эффектами. Разные типы инверсий лучше всего выживают в различных экспериментальных условиях. Так как эти типы инверсий обнаруживают разную адаптивную ценность и в лабораторных условиях, то несомненно, что то же самое происходит и в природе. Поэтому различия в частоте инверсий между тремя географическими популяциями, которые могут рассматриваться как три разные расы, вызваны в основном естественным отбором.

Аналогичные результаты были получены для трех калифорнийских рас лапчатки *Potentilla glandulosa*, растущих на уровне моря, на средней высоте над уровнем моря и в альпийской зоне. Раса с уровня моря погибает, если ее выращивать в условиях альпийской зоны, тогда как альпийская раса, выращенная на меньшей высоте, восприимчивее к ржавчинному грибу, чем расы, живущие внизу. Такие опыты показывают, что разные расы приспособлены к своей среде, но не к другой. В разных частях занимаемой видом территории имеется разная неорганическая и органическая среда — включая и обитающие там организмы. Ясно поэтому, что нет одного единственного генотипа, который был бы равно хорошо приспособлен ко всем тем разнообразным условиям, которые встречаются в пределах каждой территории. Один из способов, которым перекрестно-оплодотворяющийся вид как целое может достичь максимальной биологической приспособленности — это сохранение генетической полиморфности с разделением на географические популяции или расы, различающиеся генетически.

Различные расы перекрестно-оплодотворяющегося вида, занимающие географически разделенные территории, как это было во всех рассмотренных пока примерах, называют *аллопатрическими расами*. Различные расы, живущие на одной и той же территории, называют *симпатрическими*. Что же предохраняет симпатрические расы от слияния в одну расу в результате гибридизации, если географически они не разделены. Можно ответить на этот вопрос, рассмотрев судьбу исходно аллопатрических рас, которые оказались симпатрическими. Изменение такого типа произошло с человеком. Несколько тысяч лет назад человечество было разделено на несколько аллопатрических рас. С развитием цивилизации и совершенствованием способов передвижения многие из этих рас стали симпатрическими.

Однако обмен генами между расами, ставшими симпатрическими, иногда социально и экономически подавлялся, так что некоторые из этих рас продолжают сохранять свою индивидуальность. Другим примером того, что может произойти, когда аллопатрические расы оказываются симпатрическими, служат одомашненные растения и животные. Многие исходно аллопатрические породы или расы собак живут теперь в одной местности. Однако эти теперь симпатрические расы не обмениваются генами с частотой, достаточной для образования единой помесной породы, или расы, так как их размножение контролируется человеком. Следует, однако, помнить, что при других условиях такие аллопатрические расы, став симпатрическими, могут образовать посредством кроссбридинга одну полиморфную расу.

ВИДООБРАЗОВАНИЕ С УЧАСТИЕМ ОДНОГО ВИДА

Обычно некий вид перекрестно-оплодотворяющихся организмов состоит из нескольких рас, приспособленных к разным условиям заселенных ими территорий. Все эти расы остаются генетически связанными через межрасовые скрещивания и гибридные типы рас, так что вид как целое обладает единым генофондом, не содержащим частей, полностью изолированных друг от друга. С другой стороны, разные перекрестно-оплодотворяющиеся виды генетически разобщены. Таким образом, *генофонд любого вида так отделен от генофондов всех других видов, что ни один вид не может потерять своей индивидуальности вследствие кроссбридинга или обратного скрещивания после кроссбридинга*. Более того, генофонды разных видов изолированы друг от друга не только окружающей средой, но и в силу генетических причин.

В ходе эволюции в прошлом часто происходило образование нового вида, *видообразование*. Так как эволюция продолжается, то по-прежнему образуются новые виды. Механизм видообразования, считающийся наиболее обычным для перекрестно-оплодотворяющихся особей, предусматривает образование из одного вида двух или более. Как это может происходить?

Можно начать гипотетические с одного панмиктического генетически полиморфного вида. Так как окружающие условия разнообразны, то мы примем, что разные популяции занимают разные части территории, причем хотя между популяциями происходит скрещивание, достаточное для образования единого генофонда, тем не менее большинство скрещиваний происходит внутри популяций. Если с течением времени две (или более) таких популяций генетически расходятся, причем только одна из них приспособлена к своему месту обитания, то эти популяции становятся разными расами одного и того же вида. Различия между генофондами этих двух рас может все более и более возрастать в результате мутирования, естественного отбора и генетического дрейфа. По мере продолжения подобной дифференциации гены, которые делают каждую из этих рас приспособленной к своей собственной территории, могут вследствие их разнородных фенотипических эффектов делать скрещивания между двумя расами еще менее вероятными или могут привести к тому, что гибриды от таких скрещиваний оказываются менее приспособленными, чем особи каждой из родительских рас. Соответственно, частичная репродуктивная изоляция может быть вполне случайной или же быть побочным продуктом приспособляемости генотипов к данным условиям. Однако чем выраженнее этот эффект, тем большее преимущество при отборе следует ожидать для тех генов, которые еще сильнее увеличивают репродуктивную изоляцию двух расходящихся рас. Если расы продолжают так же генетически расходиться, то в конце концов они должны образовать отдельные и разные генофонды, и вместо двух рас одного и того же вида окажется два

разных вида. Отметим, что видообразование это необратимый процесс. После того, как генофонд достиг уровня вида, он уже никогда не утратит свою индивидуальность вследствие скрещиваний с другими видами.

В этой обобщенной схеме обычного хода видообразования *раса выступает в качестве зародыша вида*. Вспомним, однако, что при других обстоятельствах между двумя расами может происходить кроссбридинг с образованием одной общей расы. Так, несколько тысяч лет назад разные аллопатрические популяции человека определенно были разными расами, которые, если бы сохранились те же самые условия жизни, могли образовать разные виды. Однако некоторые из них слились впоследствии в одну расу вследствие того, что цивилизация и миграция облегчили кроссбридинг.

Существуют различные препятствия обмену генами между расами. Перечислим *барьеры*, которые приводят к полной репродуктивной изоляции:

1. *Географические*. Расы могут разделять водоемы, льды, горы, ветры, землетрясения и вулканическая активность.

2. *Экологические*. Изменения температуры, влажности, солнечной освещенности и питания, хищники и паразиты могут принудить частично или полностью изменить место обитания расы.

3. *Сезонные*. Сезонные изменения могут привести к тому, что разные расы оказываются фертильными в разное время года, даже если их территории и перекрываются, или если они симпатричны.

4. *Половые и поведенческие*. Внутривидовое скрещивание может быть обусловлено предпочтением определенных партнеров или вмешательством человека в ходе одомашнивания.

5. *Морфологические*. Несовместимость половых органов у разнополых особей, принадлежащих к двум различным расам.

6. *Физиологические*. Неспособность половых клеток одной расы оплодотворить клетки другой расы, так что гибридные зиготы образуются лишь изредка или вообще не образуются.

7. *Нежизнеспособность гибридов*. Даже если гибридные зиготы и образуются, их развитие может быть настолько ненормально, что не завершается.

8. *Стерильность гибридов* возможна даже в случаях, когда гибриды развиваются полностью и жизнеспособны.

Географические, экологические и сезонные различия не вызывают с необходимостью генотипических различий; однако они обеспечивают те вариации среды, которые отбирают среди имеющихся генотипов приспособленные, т. е. те, что при данных условиях имеют наибольшие репродуктивные потенции. Понятно, что исходный материал для естественного отбора должны давать мутации. Нет ни одного отдельно взятого генотипа, который был бы одинаково хорошо приспособлен к любым условиям. Поэтому в конце концов оказывается, что разные расы содержат разные генотипы. Прочие перечисленные здесь барьеры могут завершать репродуктивную изоляцию.

Сезонные, половые, морфологические и физиологические барьеры могут быть проявлением многих генов, по которым отличаются два зарождающихся вида. Нежизнеспособность гибридов может быть результатом непропорциональности развития, вызванной наличием в каждой клетке двух генетически различных геномов. Стерильность гибридов, которая может быть обусловлена таким генетическим эффектом, может возникнуть также, когда две расы слишком сильно различаются по расположению генов и вследствие структурных перестроек в хромосомах и между хромосомами, так что во время мейоза нарушается правильность синапса между двумя разными геномами у гибрида. Неправильная конъюгация вызывает ненормальное расщепление, которое приводит к анеуплоидным продук-

там мейоза. Вспомним, что анеуплоидность пыльцы летальна и что у животных анеуплоидные гаметы обычно приводят к доминантной летальности в образуемых ими зиготах. Таким образом, репродуктивная изоляция может быть проявлением как генетической активности, так и свойств хромосом.

Естественно, что с увеличением морфологического расхождения между двумя формами возрастает вероятность того, что они будут различаться физиологически, и что причина этих различий кроется в глубоких различиях и изоляции генофондов. Разумеется простого сравнения морфологии лошади и мыши достаточно, чтобы отнести их к разным видам. Следовательно, существование морфологических различий служит иногда хорошим указанием на принадлежность к разным видам. Однако при сравнении групп, теснее связанных по происхождению, оказывается, что морфологические различия не столь хорошо коррелируют с репродуктивной изоляцией. Например, европейский крупный рогатый скот и тибетские яки сильно различаются по происхождению и их обычно относят к разным родам, но эти два вида можно скрещивать. Более того, в Тибете многие быки похожи на яков, так что очень большая разница в фенотипах не обязательно приводит к полной репродуктивной изоляции близко родственных видов. С другой стороны, обратимся к *D. persimilis* и *D. pseudoobscura*. Два этих вида, считавшиеся ранее расами одного и того же вида, столь близки морфологически, что их можно различить по строению полового аппарата лишь после тщательных измерений. Тем не менее, в природе генофонды этих видов полностью изолированы даже в случаях перекрывания территорий их обитания. Такие морфологически схожие виды называют *сиблинговыми видами*. Они происходят от разных рас одного и того же вида. Кроме дрозофилы, сиблинговые виды обнаружены у комаров и других насекомых. Они найдены также и у растений — среди мадий семейства астр и у голубой дикой ржи.

Пример с *D. pseudoobscura* и *D. persimilis* иллюстрирует два других правила видообразования. Во-первых, любой отдельно взятый репродуктивный барьер имеет обычно мультигенную, а также мультихромосомную основу. Во-вторых, любые два вида разделены не одним, а несколькими репродуктивными барьерами. По отдельности каждый из этих барьеров не абсолютен, однако вместе они приводят к полной репродуктивной изоляции, — в природе нет обмена генами между их генофондами. Известны следующие различия между этими двумя сиблинговыми видами:

- 1) *D. pseudoobscura* живет в более сухой и теплой среде, чем *D. persimilis*;
- 2) самки чаще принимают попытки спаривания самцов своего вида, чем чужого;
- 3) *D. pseudoobscura* обычно спариваются вечером, а *D. persimilis* утром;
- 4) межвидовые гибриды мало жизнеспособны, а если и выживают, то в большинстве стерильны.

Природа механизмов репродуктивной изоляции, участвующих в образовании новых видов из рас, показывает, что жизнеспособные виды возникают не в результате одиночной или простой мутации, а вследствие многих разных, независимо произошедших генетических изменений. Более того, как уже отмечалось, видообразование сопровождается не только накоплением таких мутаций, которые различают расы, но и таких, которые влияют на репродуктивную изоляцию. Обычно в момент возникновения репродуктивных барьеров популяции физически разделены. Иначе гибридизация опрокинула бы эти барьеры.

Экспериментальные данные подтверждают также наши соображения о том, что естественный отбор способствует дальнейшему накоплению генетических факторов, поддерживающих репродуктивную изоляцию рас.

Выше было показано, как один вид может дать начало двум или более видам через расы, которые служат зародышами видов (Th. Dobzhansky, L. Ehrman, O. Pavlovsky и B. Spassky, 1964). Ранее было установлено, что вид обладает изолированным генофондом, т. е. генофондом, закрытым для особей с некоторыми другими альтернативными состояниями (другой вид). В генофонде вида за много поколений, по-видимому, происходят многочисленные изменения. Остается ли этот вид в итоге тем же или он оказывается новым видом? Здесь мы имеем пример видообразования такого типа, когда уже нельзя пользоваться примененным ранее критерием, так как не существует более альтернативного состояния. Если бы чудом сохранились некоторые особи исходной популяции, то мы могли бы обнаружить, что они репродуктивно изолированы от особей новой популяции. В таком случае мы могли бы допустить образование нового вида, происхождение которого зависит от «вымирания» родительского вида. Как только человек научится неограниченно долго сохранять образцы генотипов, станет возможным исследовать этот тип видообразования.

Образование нового вида может произойти в результате *аутополиплоидии* — увеличения числа геномов, присутствующих у обычно перекрестно-оплодотворяющегося вида. Механизм образования аутополиплоидных клеток, тканей и организмов уже был описан на стр. 162—165. В роде хризантем встречаются виды, у которых хромосомные числа $2n$ равны 18, 36, 54, 72 или 90. Отсюда следует, что основное число n равно 9. В роде *Solanum* (пасленовые, в том числе и картофель) основное число n равно, вероятно, 12, так как известны виды этого рода с 24, 36, 48, 60, 72, 96, 108 или 144 хромосомами. Эти два примера показывают, что в видообразовании у этих двух родов играла роль аутополиплоидия. Однако аутополиплоидию нельзя считать существенной для видообразования у форм, размножающихся в основном половым путем, так как аутополиплоиды с числом хромосом более $2n$ образуют в мейозе мультиваленты и, следовательно, многочисленные анеуплоидные гаметы. Тем не менее, анеуплоиды могут преуспеть, если их разводят бесполом путем (почкованием или прививками), как в случае триплоидных яблонь — сортов Гранвенстейн и Болдуин. Вегетативно разводят также триплоидные тюльпаны.

ВИДООБРАЗОВАНИЕ С УЧАСТИЕМ ДВУХ ИЛИ БОЛЕЕ ВИДОВ

Многие новые перекрестно-оплодотворяющиеся виды произошли не от одного единственного вида или расы, а возникли сравнительно недавно при гибридизации двух или большего числа разных видов, т. е. в результате *межвидовой гибридизации*. Хотя генофонды межвидовых гибридов не изолированы от генофондов родительских видов, эти гибриды могут образовывать преуспевающую размножающуюся половым путем популяцию со своим собственным замкнутым генофондом. Межвидовые гибриды, особенно у растений, можно превратить в устойчивые промежуточные типы, изолированные от родительских видов с помощью трех методов.

Первый метод включает *амфиплоидию* (*аллополиплоидию*, см. стр. 168). Если у одного вида $2n = 4$, а у другого $2n = 6$, то у их F_1 гибрида будет пять хромосом (рис. 18—2). Если гибрид жизнеспособен, он может оказаться стерильным, так как у каждой хромосомы нет гомолога и, следовательно, нет партнера в мейозе. В результате мейоз протекает как в гаплоидном организме и получают в основном анеуплоидные гаметы. Однако если у гибрида F_1 число хромосом удвоено (искусственно, с помощью колхицина, или спонтанно), то особь или ее часть будет обладать $2n = 10$. У каждой хромосомы окажется партнер в мейозе и образуют-

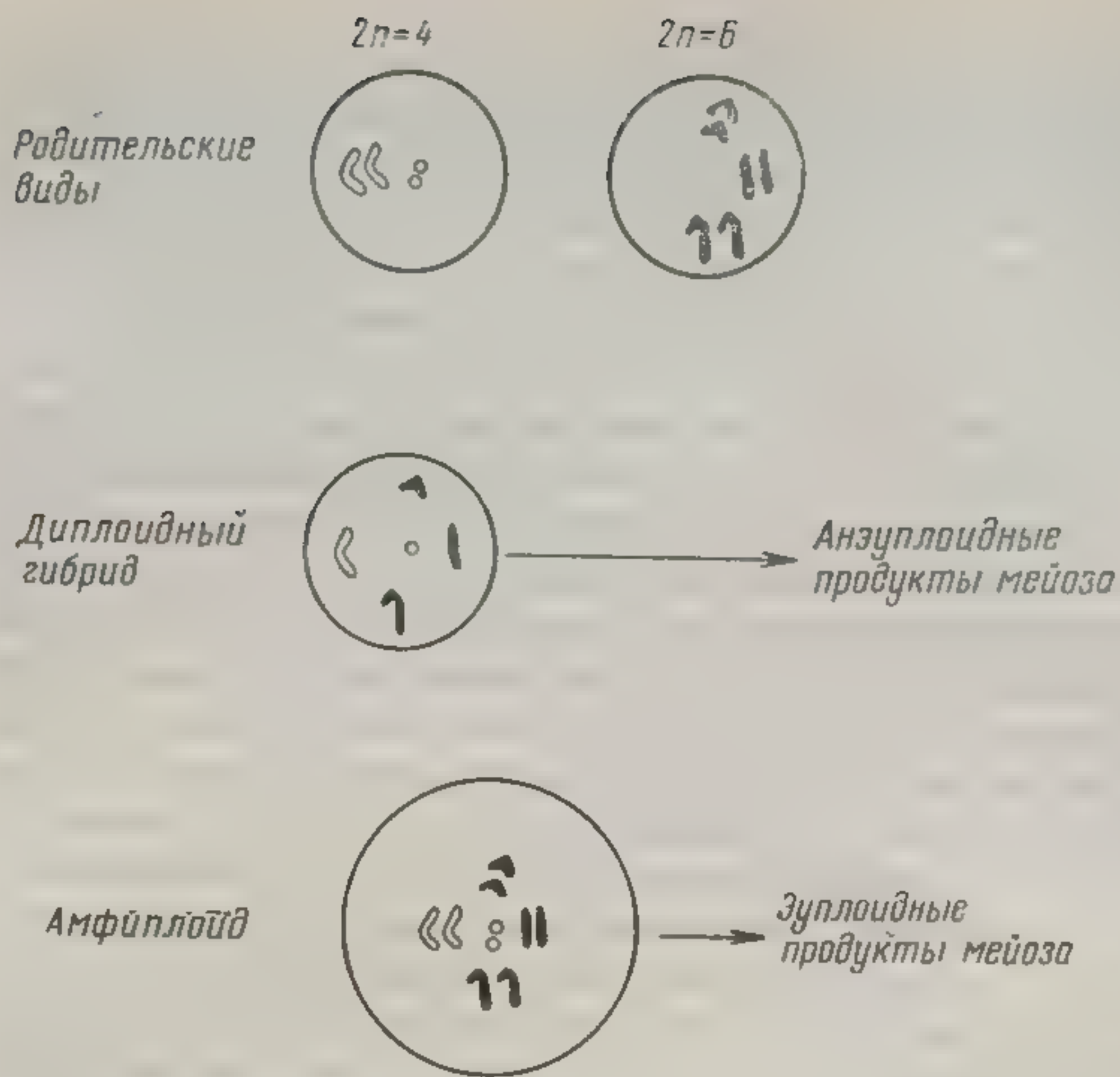


РИС. 18-2.

Образование новых видов в результате амфиплоидии (аллополиплоидии) при межвидовой гибридизации

ся эуплоидные гаметы с $n = 5$. После слияния такие гаметы дают потомство с $2n = 10$, плодовитое, фенотипически занимающее более или менее промежуточное положение между обоими родительскими видами и изолированное от них.

Подсчитано, что 20—25% современных видов цветковых растений произошли от межвидовых гибридов, число хромосом у которых удвоилось («удвоившиеся гибриды», или амфиплоиды). Более того, в прошлом многие виды, возникшие таким способом, затем дивергировали, образовав разные роды. В появлении хлопчатника в Америке и в возникновении новых видов козлобородника в наше время принимала участие спонтанная амфиплоидия.

В самом начале XIX в. во Францию и Англию случайно завезли на кораблях американскую болотную траву *Spartina alterniflora* ($2n = 70$), которая прижилась наряду с европейской болотной травой *S. stricta* ($2n = 56$). В начале XX в. появилась новая болотная трава *S. townsendii* ($2n = 126$), которая в значительной степени вытеснила оба старых вида. Хромосомное число *S. townsendii* равно сумме диплоидных чисел старых видов; она плодовита, размножается в гомозиготном состоянии и по строению занимает промежуточное положение между двумя прежними формами; следовательно, этот вид несомненно следует считать амфиплоидом *S. alterniflora* и *S. stricta*. *S. townsendii* настолько вынослива, что ее специально стали разводить в Нидерландах (для укрепления дамб) и в других странах.

Амфиплоидию можно получить также искусственно. Например, в оранжерее удастся скрестить редьку ($2n = 18$) с капустой ($2n = 18$) (рис. 18—3), получив в F_1 гибрид с 18 неконъюгирующими в мейозе хромосомами. Если, однако, число хромосом у гибрида удваивается на достаточно ранней стадии развития, то можно получить амфиплоидное потомство с $2n$, равным 36 хромосомам (по 9 пар от редьки и от капусты). Так как амфиплоид плодовит и генетически изолирован как от редьки, так и от капусты, то он представляет собой новый вид.

Если все хромосомы межвидового гибрида различны и число хромосом у гибрида удвоено, то в мейозе у каждой хромосомы будет по одному партнеру и расхождение должно протекать нормально. Поэтому вероятность успешного размножения амфиплоида увеличивается с увеличением различий между хромосомами от разных видов, которые входят в гаплоидные геномы межвидового гибрида. Неудивительно поэтому, что при гибридизации двух хромосомно близких видов у их амфиплоида в мейозе образуются триваленты и квадрилленты, что приводит к ненормальной сегрегации и стерильности.

Амфиплоидия не обеспечивает успешного размножения гибридов между близкими видами, однако есть второй способ получения устойчивых межвидовых гибридов, т. е. нового вида, при условии, что в скрещиваемых видах хромосомы весьма схожи. Если у обоих видов одно и то же гаплоидное число, то у их F_1 гибрида все хромосомы могут оказаться в мейозе попарно конъюгированными. Расщепление, независимое расщепление и кроссинговер могут дать потомство гибрида, у которого рекомбинации могут оказаться стабилизированными в природе и уже изолированными от обоих родительских видов. Рассмотрим некоторые из видов рода *Delphinium*: *D. gypsophilum* морфологически промежуточно между *D. recurvatum* и *D. hesperium*. У всех трех видов $2n = 16$. Можно скрестить «родительские» виды *recurvatum* и *hesperium*. Когда их F_1 гибрид скрещивается с *gypsophilum*, то потомство получается более нормальным и оно более плодовито, чем то, которое получается при обратном скрещивании F_1 гибрида с каким-либо из родительских видов. Аналогично, потомство от скрещиваний между *gypsophilum* и любым из родительских видов получается менее нормальным, оно не столь плодовито, как потомство от скрещивания между *gypsophilum* и гибридом родительских видов. Отсюда следует, что *gypsophilum* возник как гибрид *recurvatum* и *hesperium*. На рис. 18—4 показано распространение этих видов в Калифорнии.

Третий способ стабилизации межвидовых гибридов как нового вида состоит в интрогрессии. Здесь новый тип возникает после обратного скрещивания межвидового гибрида с одним из родительских типов. Реком-

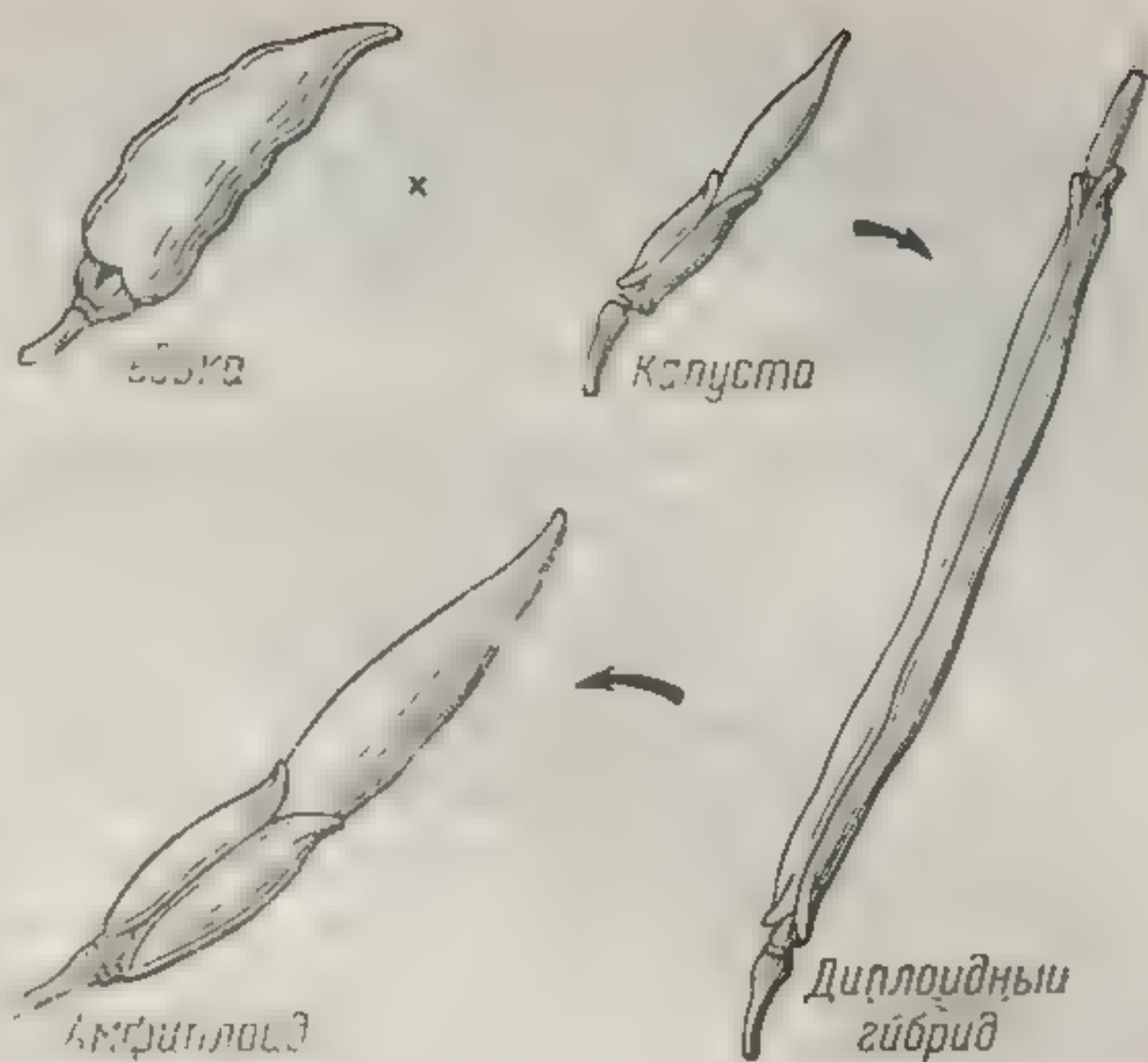


РИС. 18-3.

Стручки капусты и редьки, их гибрида и амфиплоида (по Г. Д. Карпеченко)

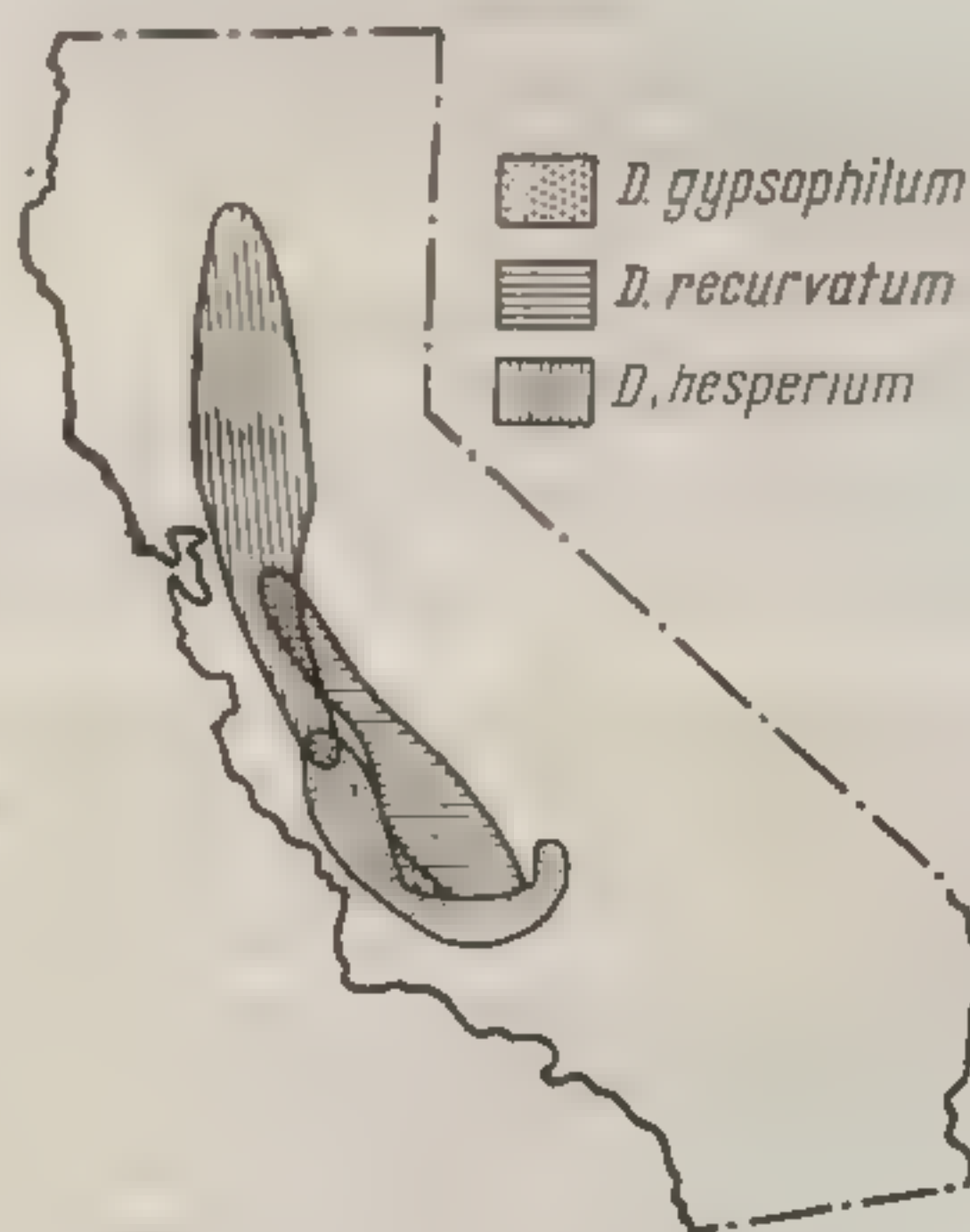


РИС. 18-4.

Распределение видов живокости в Калифорнии. Каждый вид имеет единственное место распространения

бинантные типы от обратного скрещивания, которые обладают селекционным преимуществом, могут содержать некоторые генетические компоненты от обоих видов, могут размножаться в гомозиготном состоянии и, в конце концов, стать новым видом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Расу перекрестно-оплодотворяющегося вида характеризует содержание ее генофонда. Каждая раса приспособлена к той области, где она обитает. Разные расы могут быть симпатрическими или аллопатрическими. Расы могут стать видами при накоплении генетических различий, конечный эффект которых заключается в утрате генетической непрерывности, т. е. в образовании изолированных генофондов. Два генофонда разделяются обычно совокупностью различных репродуктивных барьеров, каждый из которых не абсолютен сам по себе и имеет полигенную или полихромосомную основу, не обязательно коррелирующую с морфологическими различиями.

Общепризнано, что большинство перекрестно-оплодотворяющихся видов возникло при дальнейшей дифференциации рас. Изредка новый вид может возникнуть в результате аутополиплоидии; возможно, что новые виды могут появляться также при постепенном изменении одного вида как целого в другой вид.

Два (или более) вида могут положить начало новому виду в результате межвидовой гибридизации. Межвидовой гибрид может образовать новый вид вследствие амфиплоидии, в результате отбора из его потомства рекомбинантов или при отборе особей, получающихся после интрогрессии.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

- 18.1. Обсудите обоснованность понятия чистой расы.
- 18.2. Какие нужно сделать предположения, чтобы использовать частоты групп АВО крови для установления путей происшедших в прошлом миграций?
- 18.3. При каких условиях в будущем следует ожидать уменьшения числа человеческих рас? Увеличения этого числа?
- 18.4. Приложимо ли определение вида, использованное нами, к формам, размножающимся только бесполым путем? Почему?
- 18.5. Каковы различия между генетической и хромосомной стерильностью? Придумайте пример того и другого.
- 18.6. Обсудите гипотезу, согласно которой новый вид может возникнуть в результате отдельной мутации.
- 18.7. Необходима ли географическая изоляция для образования нового вида? Объясните.
- 18.8. Каково относительное значение мутирования и генетических рекомбинаций для образования видов?
- 18.9. Имеет ли вид природную биологическую сущность или же он — как и раса — выделен лишь для удобства рассмотрения?
- 18.10. Имеет ли биологический смысл утверждение: «Все мы принадлежим к человеческой расе»? Почему?
- 18.11. Допустим, что с другой планеты на Землю прибыли разумные существа, фенотипически неотличимые от человека. Вероятно ли, чтобы их браки с населением Земли дали фертильное потомство? Почему?
- 18.12. Придумайте условия, при которых имеющийся сейчас один вид человека мог бы эволюционировать в два или более разных видов.
- 18.13. Клетки триплоидных и тетраплоидных аутополиплоидов обычно крупнее клеток диплоида. Какое значение имеет этот факт для садоводов?
- 18.14. Г. Кихара с сотрудниками получили триплоидные арбузы (с 33 хромосомами), не образующие семян, и тетраплоидные арбузы (с 44 хро-

мосомами), образующие семена бóльших размеров, чем семена диплоида. Как эти типы были получены? Как они поддерживаются?

18.15. В каждом из приведенных ниже случаев экспериментально мог быть получен межвидовой гибрид. Сформулируйте свои предположения относительно того, упрочатся ли в природе гибриды, полученные от описанных ниже родителей.

а) В Калифорнии кипарис Монтерея растет на скалах побережья, тогда как аллопатрический кипарис Говена растет на песчаных пустошах в двух милях от берега.

б) В Калифорнии встречаются два симпатрических вида сосны.

Один из них, сосна величественная, распространяет пыльцу до марта. Другой вид, епископская сосна, распространяет пыльцу несколько позже.

в) У гибрида между *Crepis neglecta* ($n = 4$) и *C. fuliginosa* ($n = 3$) при мейозе наблюдаются как спаренные, так и неспаренные хромосомы и мультиваленты.

18.16. При скрещивании *Drosophila pseudoobscura* с *D. persimilis* получают стерильные самцы, но самки частично плодовиты. Можно, используя маркированные хромосомы, скрестить самку межвидового гибрида с *D. pseudoobscura*, и у их потомства могут быть различные сочетания хромосом от двух видов. Если определять длину семенника у самцов, полученных при таком обратном скрещивании, то оказывается, что если X-хромосома получена от *D. pseudoobscura*, то семенники по существу нормальные. Если же X-хромосома получена от *D. persimilis*, то семенники короче, причем эта аномалия усиливается с ростом числа аутосом, получаемых от *D. pseudoobscura*. Какой вывод относительно репродуктивных барьеров можно сделать из этих результатов?

18.17. Виды хлопчатника *Gossypium hirsutum* и *G. barbadense* тетраплоидны ($2n = 52$); фенотипически они занимают промежуточное положение между диплоидными видами *G. herbaceum* и *G. raimondii*. У каждого из них $2n = 26$. Что могут сказать приведенные ниже результаты цитологического анализа мейоза различных гибридов относительно происхождения этих видов?

а) У *barbadense* \times *raimondii* наблюдается 13 пар и 13 отдельных хромосом.

б) У *barbadense* \times *herbaceum* наблюдается 13 пар и 13 отдельных хромосом.

в) У *raimondii* \times *herbaceum* видно 26 отдельных хромосом.

18.18. Как Вы полагаете, что общего между следующими двумя случаями?

а) Эволюции кукурузы в процессе искусственного отбора *Zea mays* способствовали гены, полученные от теосинте *Zea mexicana*.

б) Культивируемая пшеница содержит гены устойчивости к ржавчине, полученные от хромосом коленицы.

ЛИТЕРАТУРА

- Th. Dobzhansky. Genetics and the Origin of Species. 3rd ed. N. Y., 1951.
Th. Dobzhansky. Evolution, Genetics and Man. N. Y., 1955.
Th. Dobzhansky, L. Ehrman, O. Parlovsky, B. Spassky. The Superspecies *Drosophila paulistorum*. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 3.
E. O. Dodson. Evolution: Process and Product (Rev. Ed.). N. Y., 1960.
L. C. Dunn, Th. Dobzhansky. Heredity, Race and Society. 3rd ed. N. Y., 1957.
P. R. Ehrlich, R. W. Holm. The Process of Evolution. N. Y., 1963. (П. Эрлих, Р. Холм. Процесс эволюции. М., изд-во «Мир», 1966).
E. Mayr. Animal Species and Evolution. Cambridge, 1963.
D. J. Merril. Evolution and Genetics. N. Y., 1962.
G. L. Stebbins. Variation and Evolution in Plants. N. Y., 1950.

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ГЕНОВ

В предыдущих главах наше внимание при определении генетического материала концентрировалось на его способности рекомбинировать и мутировать; здесь мы рассмотрим химическую природу генетического материала, данные о которой были получены в результате проведения химических анализов. Попытаемся определить, какие из клеточных компонентов могли бы выполнять роль генетического материала, а какие — нет. Так как известно, что генетический материал содержится в хромосомах ядра, можно сразу исключить из обсуждения любое химическое вещество, встречающееся только в цитоплазме. Поскольку генетический материал обладает, по-видимому, сложными свойствами, следует ожидать, что и химическая структура его должна быть соответственно сложной. Исходя из этого, можно также исключить из обсуждения все неорганические соединения (соединения, не содержащие углерода), так как ни один класс неорганических соединений не участвует в достаточно большом количестве химических реакций.

Одной из уникальных особенностей протоплазмы является скорость и упорядоченность ее химической активности. Эти два свойства обусловлены присутствием белков в форме ферментов и клеточных структур. Различные типы белков содержат различное количество аминокислот. В белках тех или иных организмов найдено около 20 различных типов аминокислот, общее же число различных комбинаций практически неисчерпаемо для любой реальной ситуации. Белок обладает достаточно сложной структурой, поэтому гипотеза о белковой природе генетического материала представляется вполне разумной.

Если бы ген был белком, то следовало ожидать обнаружения белка в хромосомах. Более того, можно было бы надеяться найти в хромосомах уникальный тип белка, не встречающийся в цитоплазме. Химическими анализами ядер и хромосом было показано, что такие белки действительно существуют — это *гистоны*. Гистоны представляют собой сложные белки, обладающие свойствами оснований и впервые найденные в хромосомах. Несмотря на то, что гистоны найдены в хромосомах многих клеток, они присутствуют отнюдь не во всех видах клеток. Так, этот белок обычно содержится в соматических ядрах рыб; однако в спермиях форели, лосося, осетра и сельди вместо него обнаруживают другой основной белок — *протамин*, более простой по составу. Протамин, содержащийся в спермиях рыбы, в свою очередь, замещен гистоном в соматических клетках, образующихся после оплодотворения в результате митотического деления. Если допустить, что генетический материал — это белок, то следует считать, что генетическая специфическая информация должна передаваться от протамина к гистону и от гистона снова к протамину. Следовательно, по крайней мере у некоторых организмов, генетическая специфичность должна быть связана с двумя химическими формами — протамином и гистоном.

Существующие представления не противоречат гипотезе о существовании генетического материала в двух альтернативных по химическому составу формах. При этом генетический материал, независимо от той или иной его формы, должен быть способным осуществлять определенные функции согласно уже установленным выше принципам.

РИС. 19-1.
Тотальный препарат неповрежденной слюнной железы личинки дрозофилы. Окрашенная ДНК видна только в ядрах (J. Schultz)

PHC. 19-1.

Тотальный препарат неповрежденной слюнной железы личинки дрозофилы. Окрашенная ДНК видна только в ядрах (J. Schultz)

Органические основания. Хромосомная ДНК содержит органические циклические соединения, в состав которых всегда входит азот. Основная N-содержащая структура представляет собой шестичленное кольцо, подобное бензолу C_6H_6 . На рис. 19—2,а показана структурная формула бензола. На рисунке 19—2,а' дана сокращенная формула, в которой атомы углерода в кольце не обозначены буквами, а на рисунке 19—2а" представлена еще более сокращенная формула, в которой не показаны также водородные атомы, связанные с кольцом углеродных атомов. Основное N-содержащее кольцо в ДНК называется пиримидином. В бензольном кольце пиримидина (рис. 19—2,б) СН группы замещены в первом и третьем положении азотом (N). На рис. 19—2,б' и 19—2,б" пред-

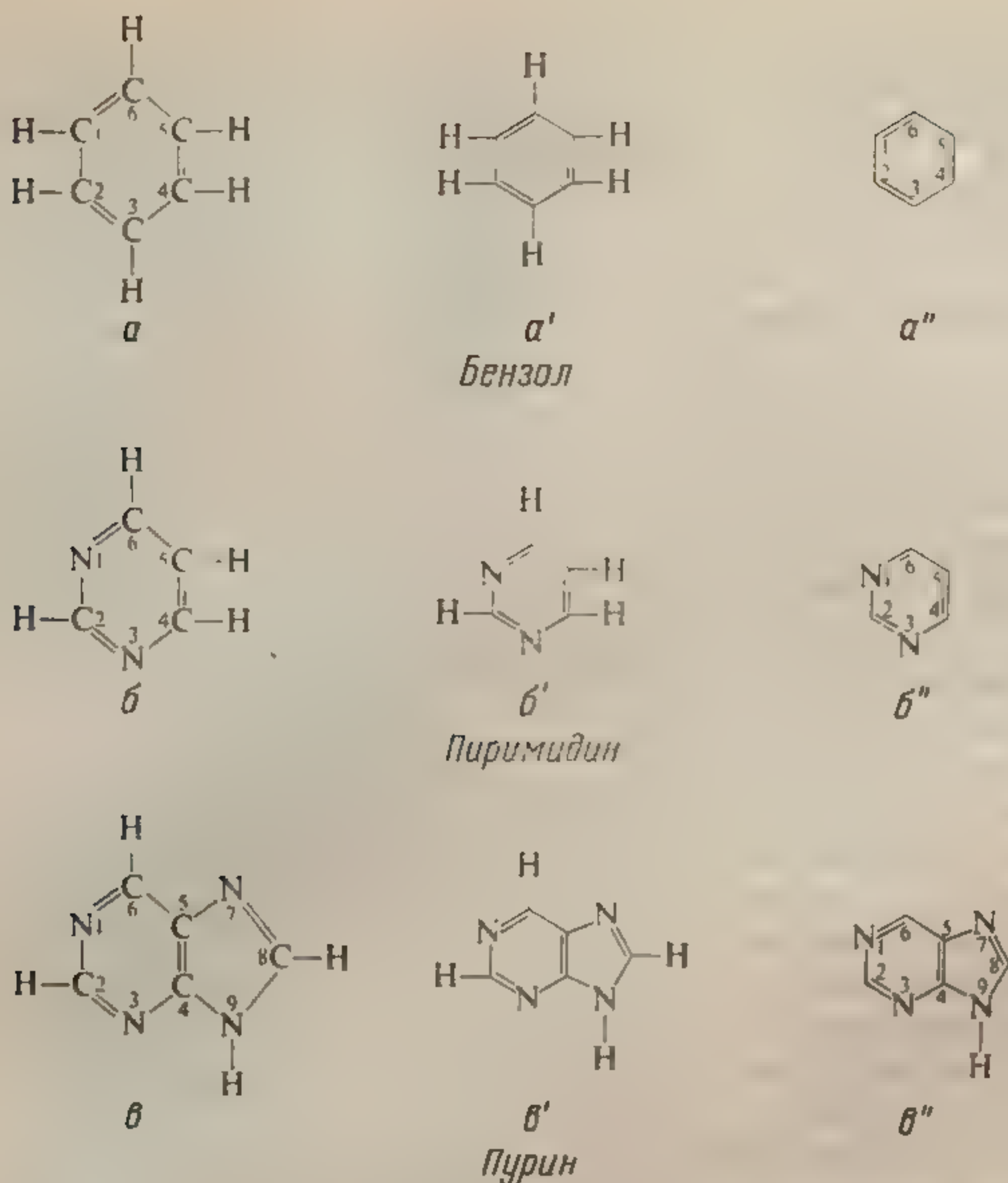


РИС. 19-2.

Родство между некоторыми циклическими соединениями

ставлены формулы пиримидина, сокращенные подобно тому, как это было сделано с формулой бензола.

Азот, найденный в ДНК, содержится также в производном основного пиримидинового кольца, так называемом пурине. Молекула пурина состоит из пиримидинового кольца без атомов водорода в положениях 4 и 5, к которым присоединено пятичленное *имидазольное кольцо*, в результате чего углеродные атомы в этих положениях оказываются составной частью обоих колец (как показано на рис. 19—2, в, в' и в''). Впредь для обозначения пуринов и пиримидинов будут использоваться наиболее сокращенные структурные формулы. Так как все пиримидины и пурины химически ведут себя как основания, они названы *органическими основаниями*.

Рис. 19—3 показывает структурные формулы различных типов пиримидинов, причем названия тех, которые найдены в ДНК, подчеркнуты. Заметим, что все производные пиримидина содержат в положении 2 кислород, замещающий атом водорода, который перемещается в положение 3.

Показано, что этот кислород находится в *кето-форме* ($O = C \begin{matrix} \nearrow R \\ \searrow R \end{matrix}$, где

R представляет собой какой-то радикал или атом, но не водород). В ДНК обычно встречаются пиримидины *цитозин* и *тимин*. Цитозин отличается от основного пиримидинового кольца тем, что вместо Н содержит *амино-группу* (NH₂), соединенную с углеродом в положении 6. Соответственно

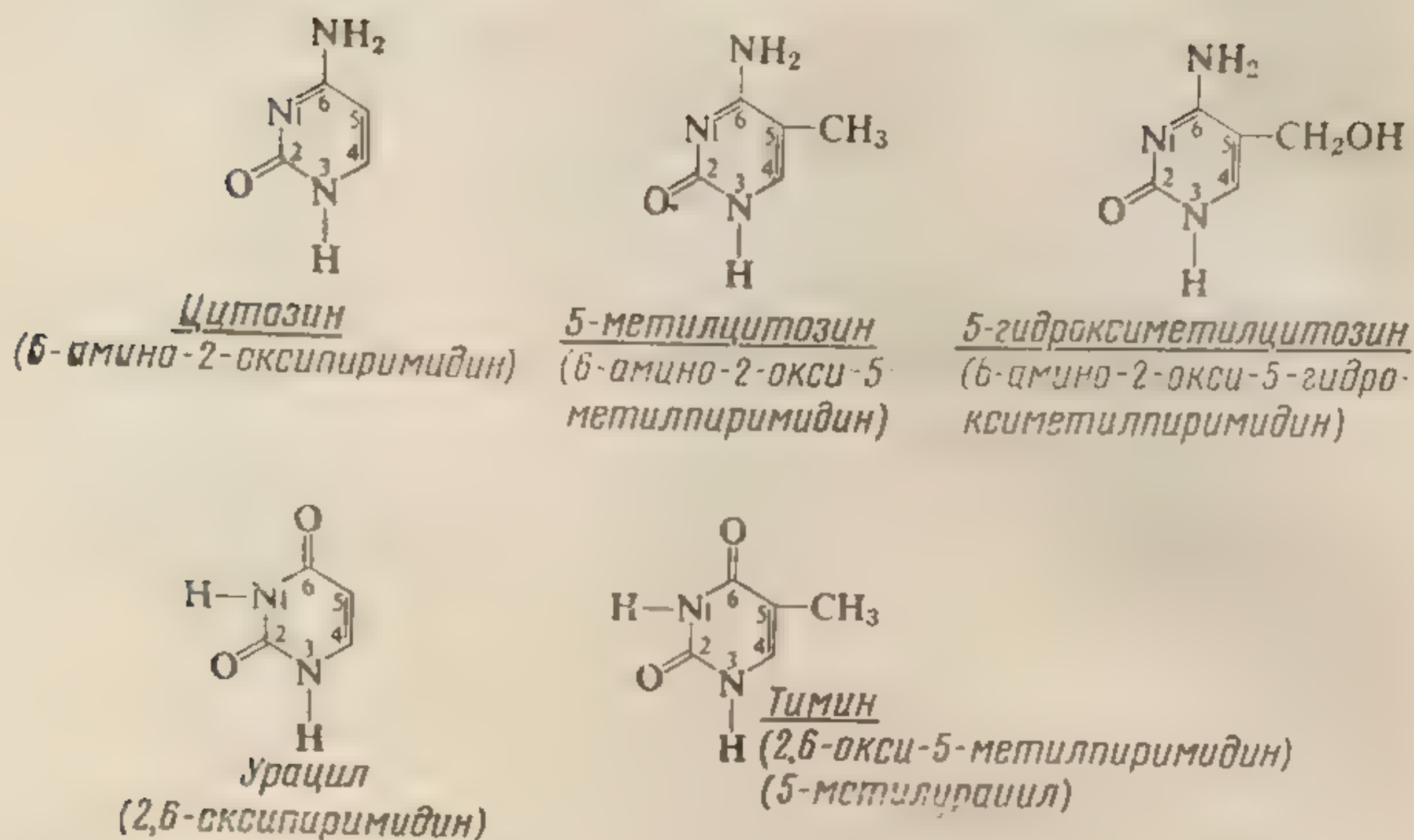


РИС. 19-3.

Пиримидины. Названия пиримидинов, встречающихся в ДНК, подчеркнуты

этому цитозин может быть назван также 6-амино-2-оксипиримидином. Замещение в цитозине водорода в положении 5 метильной группой (CH_3) дает 5-метилцитозин; этот пиримидин найден в заметных количествах в ДНК проростков пшеницы и в виде следов у млекопитающих, рыб и насекомых. Другой пиримидин, найденный только в ДНК определенных вирусов, поражающих бактерии, имеет оксиметильную группу (CH_2OH), замещающую Н в положении 5 цитозина, и назван поэтому 5-гидроксиметилцитозином.

Другой обычно встречающийся в ДНК пиримидин — это тимин. Тимин — единственный пиримидин, в котором кето-группа замещает водород в положении 6; кроме того, в тимине водород в положении 5 замещен метильной группой. Поэтому тимин можно назвать 2,6-диокси-5-метилпиримидином. Следует отметить, что различия между пиримидинами обусловлены в основном характером групп в положениях 5 и 6 кольца.

На рис. 19—4 приведены структурные формулы различных пуринов; названия пуринов, найденных в ДНК, подчеркнуты. Два пурина, обычно встречающиеся в ДНК, — это аденин и гуанин. Формула аденина отличается от основной формулы пурина наличием NH_2 группы вместо Н в положении 6; поэтому его можно обозначить также как 6-аминопурин. Производное аденина, имеющее CH_3 группу вместо Н в NH_2 группе в 6 положении, получило название 6-метиламинопурина. В ДНК найдены ограниченные количества этого пурина.

Другой пурин, наиболее часто встречающийся в ДНК, — это гуанин (рис. 19—4). Гуанин имеет NH_2 группу в положении 2 и О в кето-форме в положении 6. Он может быть назван также 2-амино-6-оксипурином. Следует указать, что различия между пуринами определяются главным образом природой групп, присоединяющихся во 2 и 6 положениях двойного кольца.

Пентозы. D-рибоза представляет собой сахар (рис. 19—5,а), содержащий пять атомов углерода (пентоза), причем четыре атома углерода

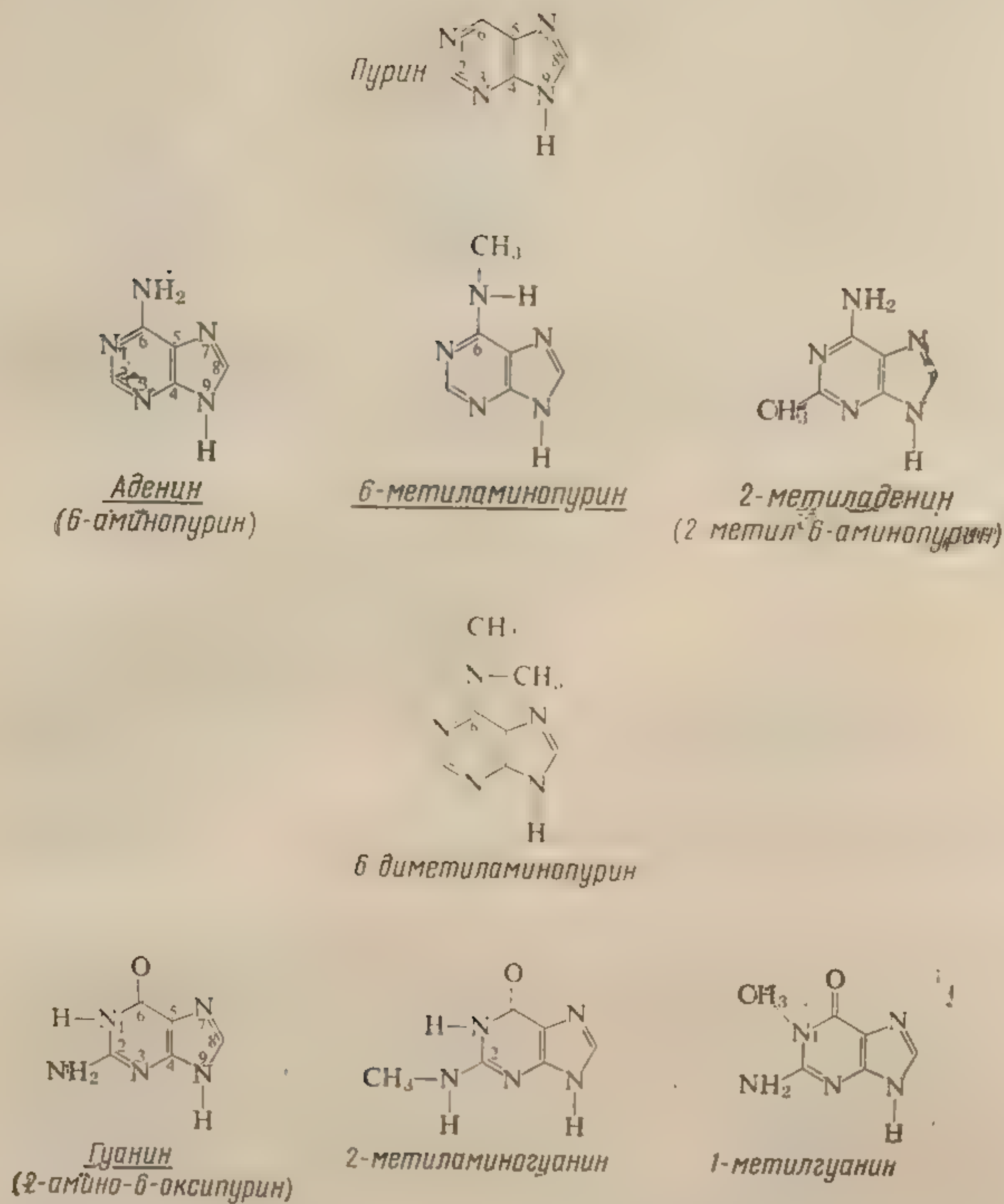


РИС. 19-4.

Пурины. Названия пуринов, встречающихся в ДНК, подчеркнуты

и один атом кислорода образуют пятичленное кольцо. На рис. 19—5,а', согласно ранее принятому условию, не показаны атомы углерода кольца. Углеродные атомы пентозы представлены номерами, показывающими их положение в молекуле. ДНК содержит пентозу, которая представляет собой модифицированную D-рибозу, утратившую кислород в положении 2, в результате этот сахар называют 2'-дезоксид-рибозой, или просто 2-дезоксидрибозой, или дезоксирибозой (рис. 19—5,б и б').

Дезоксирибозиды. Каждое пуриновое или пиримидиновое основание в ДНК обычно соединено с сахаром дезоксирибозой, образуя дезоксирибонуклеозид, или дезоксирибозид. Четыре основных дезоксирибозида, содержащиеся в ДНК,— это дезоксицитидин, (дезокси)тимидин, дезоксиаденозин и дезоксигуанозин, соответственно основаниям цитозину, тимину, аденину и гуанину. Структура этих дезоксирибозидов показана на рис. 19—6. Дезоксирибоза всегда соединена с этими основаниями в положении 1', пиримидины же соединены с ней в положении 3, а пурины — в положении 9.

Дезоксириботиды. В ДНК фосфатная группа (PO_4) всегда соединена с дезоксирибозидом, образуя дезоксирибонуклеотид, или дезоксирибо-

тид. Фо
в общей
дезоксир
а в каче
Дезок
нина на
дезоксиад
ной един
фата, сое
из дезокс
с пирими
аденином
Полиб
отдельны
(полидезок
ми котор
этих звен
фосфата,
могут быт
атом кисл
сахара, на
ция имеет
зида при
на двух м
5'-монофос
фатной св
полидезок
указать, ч
ветвленну
связи и л
ствующих
не оказы
встречатьс
риботидны
считается в

тид. Фосфат присоединен в положении 3' или 5' сахара (как показано в общей схеме на рис. 19—7). Детально это показано на рис. 19—8 для дезоксирибонуклеотидов, содержащих в качестве пиримидина цитозин, а в качестве пурина аденин.

Дезоксирибозид-5'-монофосфаты цитозина, тимина, аденина и гуанина называются соответственно *дезоксицитидиловой*, *тимидиловой*, *дезоксиадениловой* и *дезоксигуаниловой кислотами*. Таким образом, основной единицей ДНК является дезоксирибонуклеотид; он состоит из фосфата, соединенного с дезоксирибозидом, который, в свою очередь, состоит из дезоксирибозы, связанной с одним из органических оснований: либо с пиримидинами (обычно цитозином и тиминам), либо с пуринами (обычно аденином и гуанином).

Полидезоксириботиды. Хромосомная ДНК представлена не в виде отдельных дезоксирибонуклеотидов, а в виде *полидезоксирибонуклеотидов* (*полидезоксириботидов*). Эти молекулы представляют собой цепи, звеньями которых служат отдельные дезоксириботиды. Способ соединения этих звеньев легко понять, если рассмотреть два дезоксирибозид-5'-монофосфата, представленных в правой части рис. 19—8. Эти два соединения могут быть объединены друг с другом, если самый верхний (на рисунке) атом кислорода, изображенного внизу соединения, замещает гидроксил сахара, изображенного вверху соединения в положении 3'. (Эта же реакция имеет место при присоединении фосфата в положении 3' дезоксирибозид-5'-монофосфата, как показано на двух молекулах в левой части рис. 19—8). Поскольку дезоксирибозид-5'-монофосфаты способны соединяться друг с другом посредством фосфатной связи в положении 3', образуются длинные неразветвленные цепи полидезоксириботидов. На рис. 19—9 показана часть такой цепи. Следует указать, что полидезоксириботид представляет собой линейную, неразветвленную молекулу, *скелет* которой составляют эфир-фосфатные связи и линейность которой не зависит от природы оснований, присутствующих в любой данной точке. Это значит, что на структуру цепи не оказывает влияния последовательность оснований, которые могут встречаться в любом порядке. Следует указать также, что этот дезоксириботидный *полимер* (молекула, составленная из ряда идентичных единиц) читается не одинаково в зависимости от направления. В направлении,

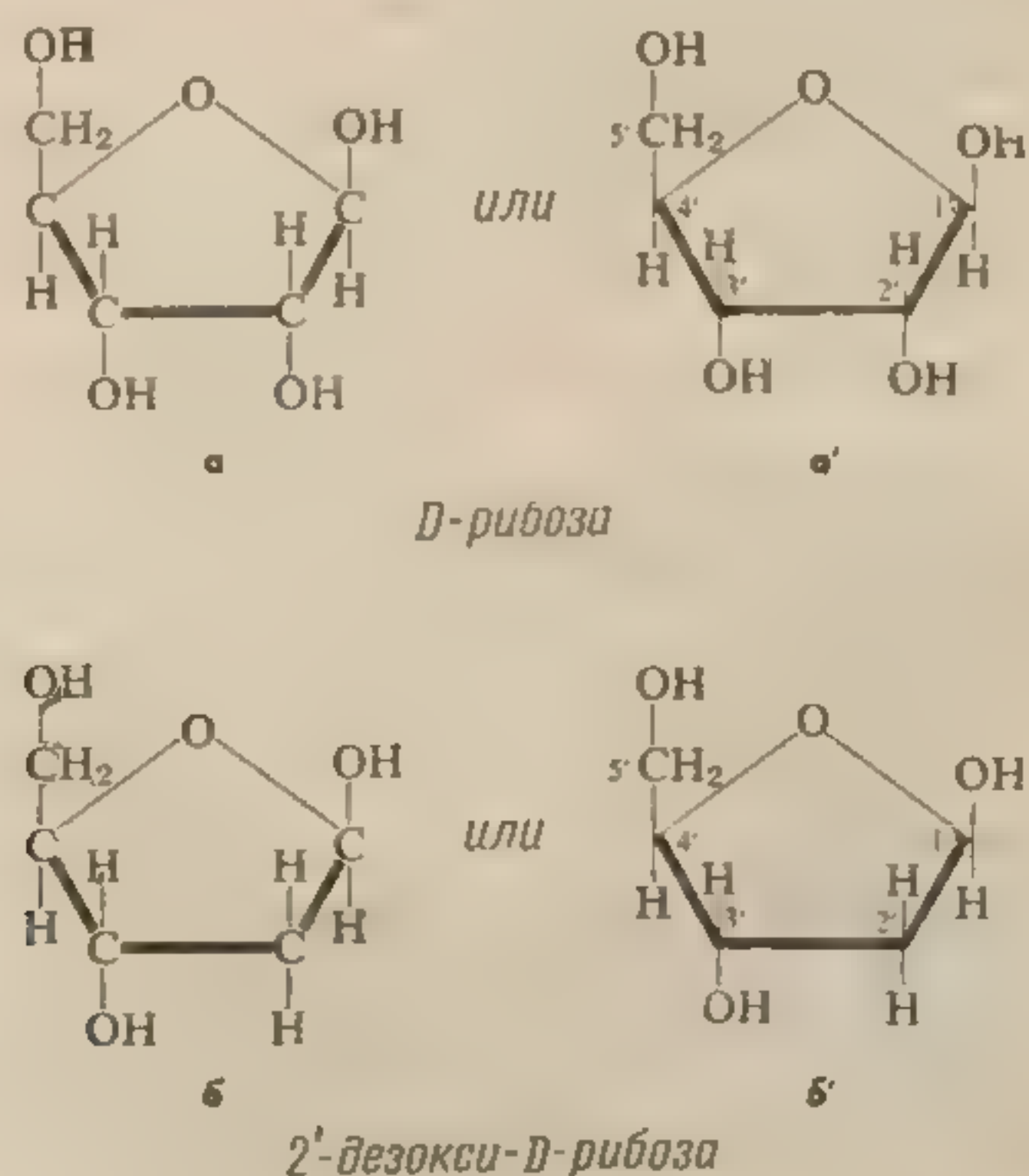
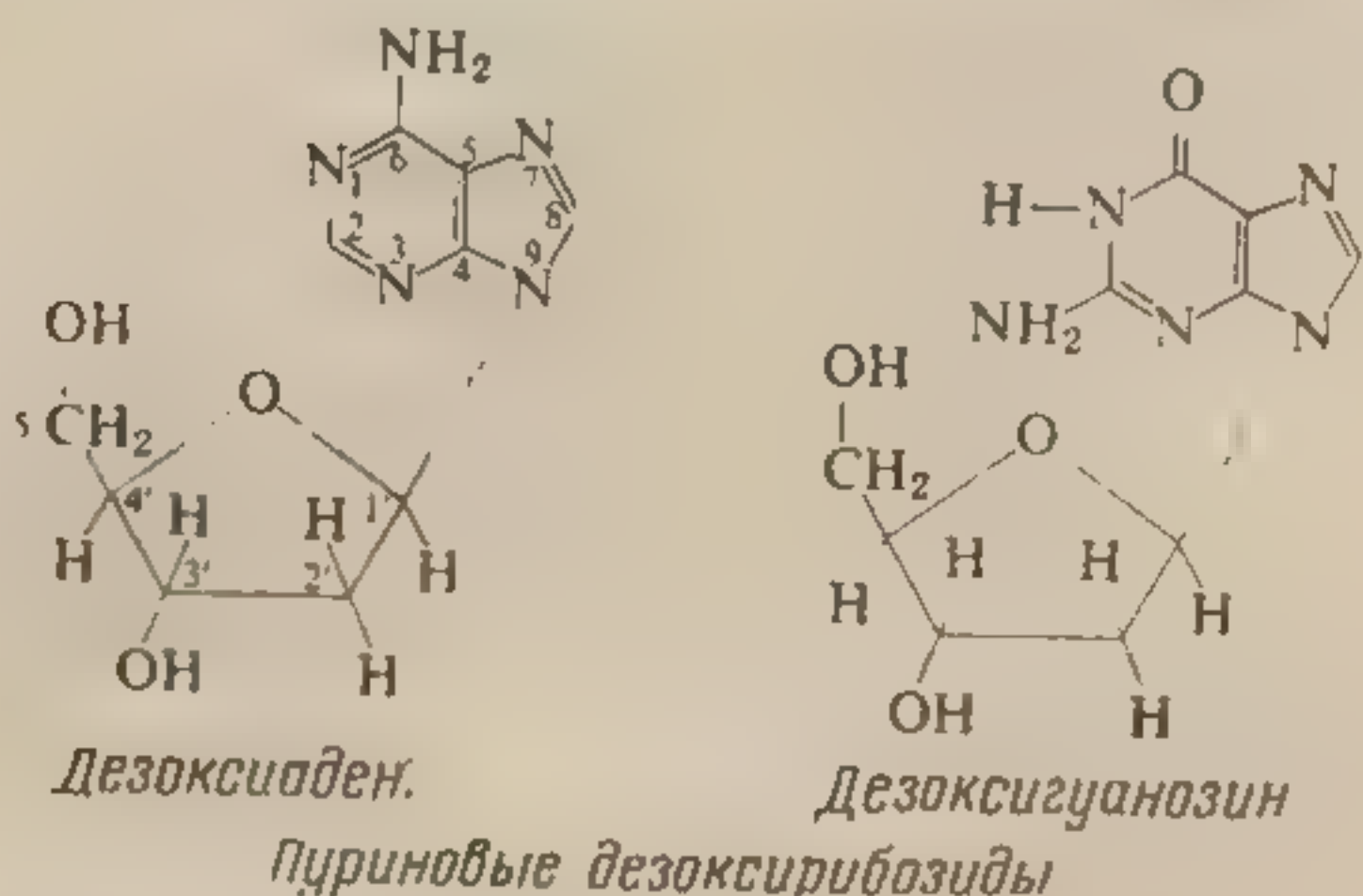
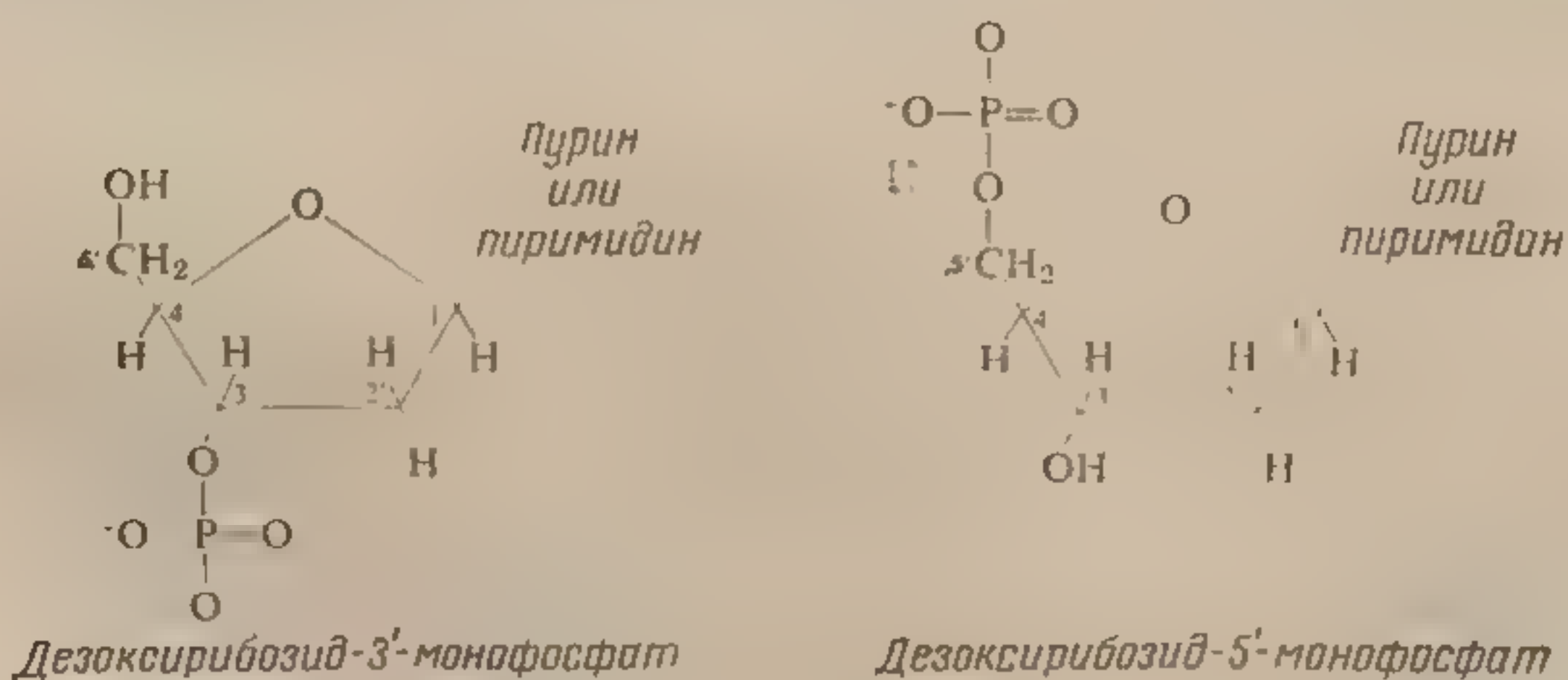


РИС. 19-5.
Пентозы, встречающиеся
в нуклеиновых кислотах



указанном на рис. 19—9 стрелками, от сахара к фосфатам связи читаются как 3'5', 3'5' и т. д., тогда как в противоположном направлении они читаются как 5'3', 5'3' и т. д. Поэтому полимеризованную молекулу ДНК называют *поляризованной*.



ИЗМЕРЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДНК

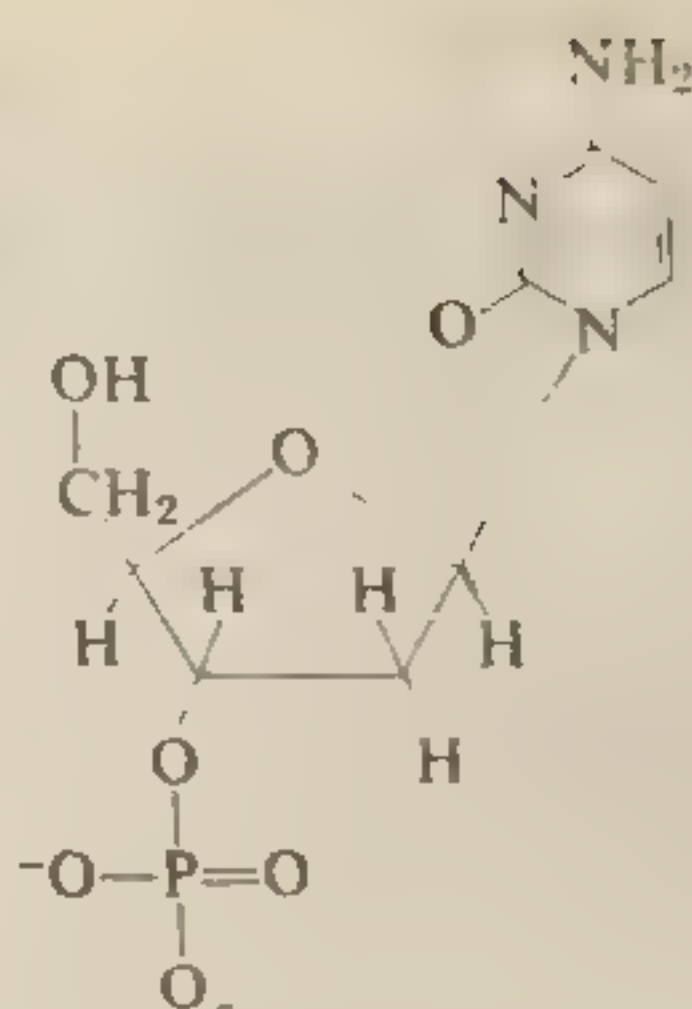
274

ДНК используют всю ткань. Иногда химический анализ осуществляется при использовании массы ядер, протоплазма же, окружающая их, удаляется посредством специальной обработки. В результате такого исследования можно определить среднее количество ДНК на ядро.

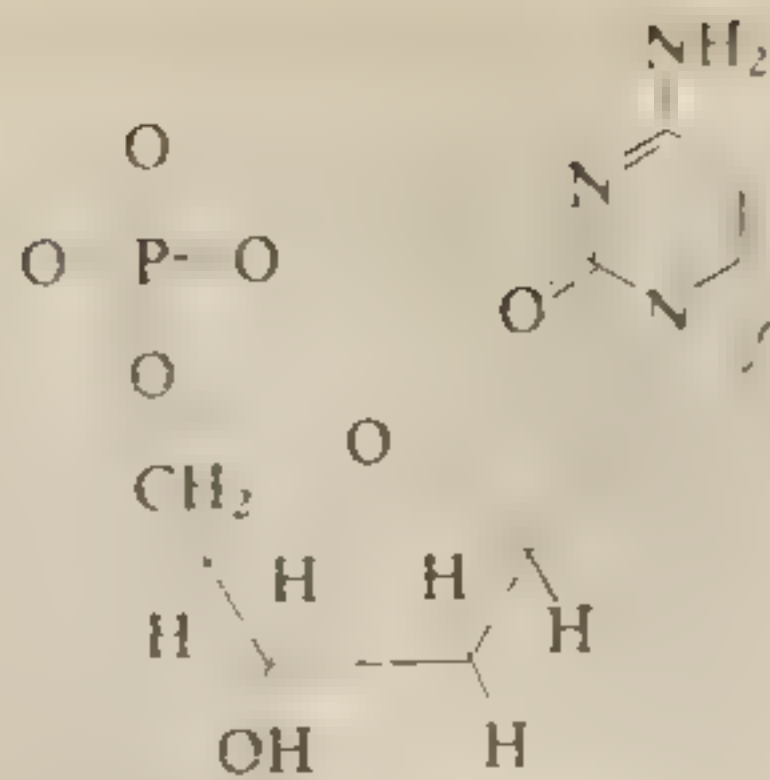
Вторым важным методом следует считать *цитохимический метод*, с помощью которого определяют содержание ДНК в отдельных ядрах, хромосомах или хромосомных участках. Он основан на том, что ДНК представляет собой единственное вещество в клетке, способное окрашиваться при соблюдении определенных условий. ДНК окрашивается в пурпурный цвет при применении метода Фельгена (см. стр. 16), тогда как использование красителя метиленового зеленого ведет к окраске ее в зеленый цвет. Специфичны для ДНК не только красители, исполь-

зуемые с соблюдением определенных правил. Оказалось, что степень окрашивания прямо пропорциональна количеству ДНК. Определенное количество красителя, сохраняющееся в ядре, дает определенный эффект, выражающийся в изменении количества лучей с различной длиной волн, проходящих через ядро. Измерение этого количества может быть использовано для количественного определения ДНК, присутствующей в ядре. Например: окрашенные ядра помещаются под микроскоп; через ядра пропускаются волны видимого спектра различной длины и делается серия фотографий; содержание ДНК в ядре измеряется по изменениям плотности ядра. Этот метод назван *микроспектрофотометрическим*, соответственно названиям составляющих его процедур.

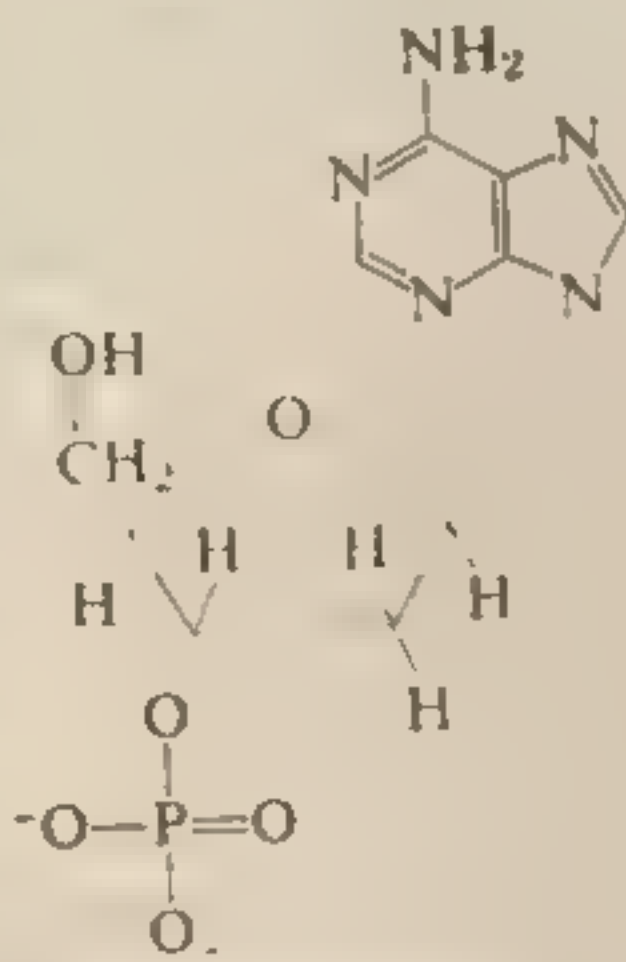
Несколько иное применение микроспектрофотометрии основано на другом свойстве пуринов и пиримидинов ДНК. Эти основания способны поглощать ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 2600 Å (*единиц Ангстрема*). Если все другие вещества, поглощающие ультрафиолетовые лучи с такой длиной волны, удалены посредством обработки ферментами, то количество ДНК можно определить или другим каким-либо способом, то количество ДНК можно определить по ее способности поглощать лучи этой длины волны. Чтобы проверить правильность этого метода, ДНК удалялась из хромосомы с помощью ферментов дезоксирибонуклеаз (ДНКаз). Эти органические катализаторы ферментов вызывают распад длинных цепей ДНК на короткие участки, которые затем могут быть вымыты из хромосом и ядер. В результате такой обработки наблюдают ожидаемую потерю способности поглощать ультрафиолетовые лучи.



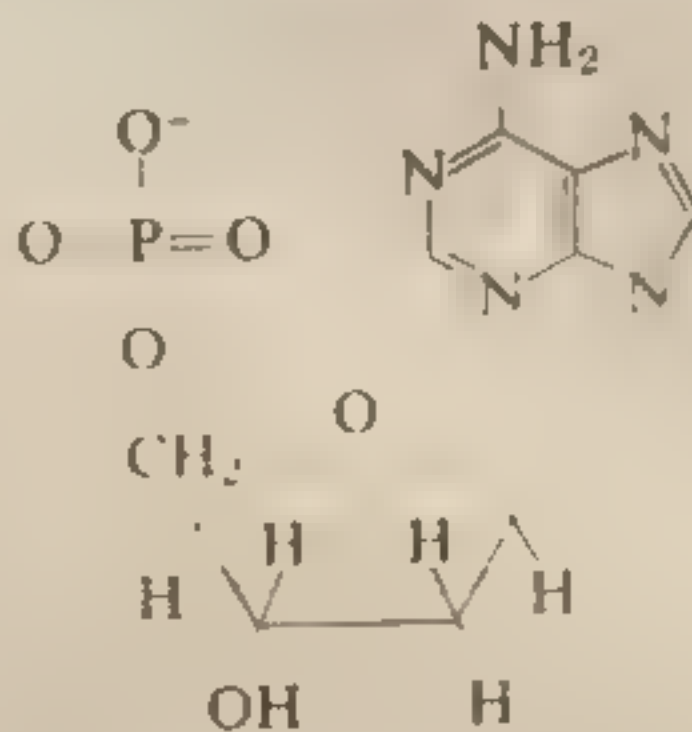
Дезоксицитидин-3'-монофосфат



Дезоксицитидин 5'-монофосфат или дезоксицитидиловая кислота



Дезоксиаденозин-3'-монофосфат



Дезоксиаденозин 5'-монофосфат или дезоксиадениловая кислота

РИС. 19-8.

Специфические дезоксирибонуклеотиды

ДНК КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

Рассмотрев данные о химической природе и количественном определении хромосомной ДНК, мы перейдем теперь к обсуждению некоторых результатов, которые указывают на связь между хромосомной ДНК и генетическим материалом ядра:

1. Количество ДНК во время метаболической стадии увеличивается до тех пор, пока оно не становится ровно в два раза больше (в пределах экспериментальной ошибки) количества ДНК, присутствовавшего в начале этой стадии. При митотическом делении ДНК распределяется поровну между двумя телофазными ядрами. Поэтому сразу после завершения их формирования все диплоидные ядра особи содержат примерно одинаковое количество ДНК.

2. Количество ДНК в гаплоидных гаметах составляет примерно половину того количества, которое найдено во вновь сформированных диплоидных метаболических ядрах той же особи. Оплодотворение, в результате которого восстанавливаются диплоидные хромосомы, восстанавливает содержание ДНК, характерное для диплоидной клетки.

3. В полиплоидных клетках наблюдается пропорциональное ploидности увеличение количества ДНК.

4. Ядра различных клеток, например, в слюнных железах личинок дрозофилы, могут проявлять различную степень полиемии в их хромосомах. Количество ДНК в этих различающихся ядрах оказалось пропорциональным их объему, что считают прямым следствием различий в степени полиемии.

5. Способность ультрафиолетовых лучей разных длин индуцировать мутации у грибов, пшеницы, дрозофилы и других организмов соответствует способности ДНК поглощать лучи с такими длинами волн.

6. С помощью атомов, меченных либо радиоактивностью, либо тем, что они имеют ненормальный вес, показано, что многие клеточные компоненты постоянно замещаются в процессе метаболизма. Однако, несмотря на такой «атомный обмен», общее количество клеточного содержимого не увеличивается. ДНК оказалась в этом отношении необычным соединением, которому свойственен лишь небольшой (если свойственен вообще) обмен; иными словами, ДНК сохраняет свою целостность на молекулярном уровне.

7. ДНК представляет собой линейный неразветвленный полимер, что соответствует нашим представлениям о генетическом материале как о линейной последовательности генов. Биполярными оказываются как промежуточные гены, так и каждый промежуточный сегмент ДНК, поскольку каждый из дезоксирибозидов соединяется только с двумя другими дезоксирибозидами посредством своих 3' и 5' углеводных связей с фосфатом.

Данные о клеточной локализации ДНК, а также все прочие приведенные выше сведения во всех отношениях согласуются с точкой зрения, согласно которой либо сама ДНК представляет собой генетический материал, либо она intimately связана с этим материалом.

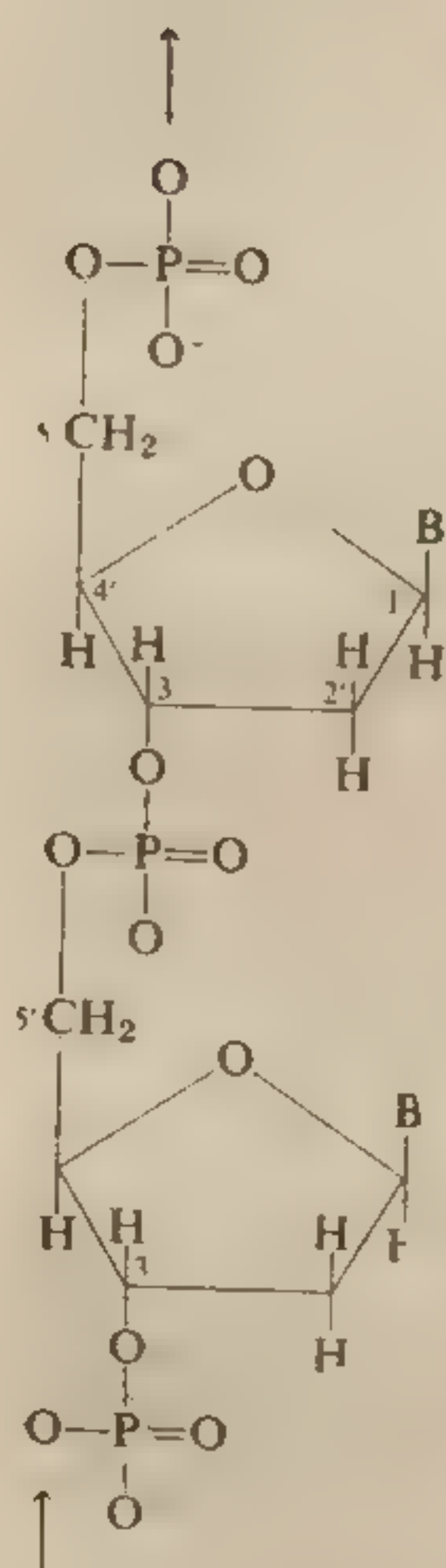


РИС. 19-9.

Полидезоксириботид

В — пиримидиновые или пуриновые основания соответствующего типа (обычно цитозин, тимин, аденин или гуанин)

Кроме ДНК в хромосомах обычно встречаются и другие вещества. Содержимое хромосомы и между собой. Это вещество, представляющее собой хромосомный материал, следует считать основным ввиду его

Хромосомы — неразветвленные полимерные структуры, представляющие собой длинные молекулы ДНК; отсюда следует, что ДНК найдено в хромосомах. Пиримидиновые (обнаружены в типичной ДНК) и два пурина найдены и в хромосомах. В хромосомах содержится фосфат и в ДНК, т.е. риботид, е. сахар Р-рибозы, встречаемых в ДНК.

Нуклеиновая кислота

ДНК

РНК

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ РНК

Кроме ДНК существует другой тип нуклеиновой кислоты, найденный в хромосомах. Она названа *рибонуклеиновой кислотой*, или *РНК*. РНК обычно встречается в комбинации с белком в форме рибонуклеопротеида. Содержание РНК в хромосомах варьирует в пределах одной клетки и между диплоидными клетками одного и того же организма, соответственно метаболической активности клеток. Поэтому гипотеза, предполагающая, что химической основой генов в типичных (ДНК-содержащих) хромосомах служит РНК, представляется маловероятной. Тем не менее следует обсудить данные о химическом составе РНК, в особенности имея в виду ее сходство с ДНК.

Хромосомная РНК, подобно ДНК, представляет собой длинный неразветвленный полимер, состоящий из основных единиц, так называемых рибонуклеотидов, или *риботидов*. Риботид, подобно дезоксириботиду, представляет собой комбинацию органического основания, пентозы и фосфата; отличие от ДНК состоит в том, что в данном случае пентоза представлена *D-рибозой* (рис. 19—5), а не 2'-дезоксид-*D-рибозой*. Другое отличие найдено в пиримидиновых основаниях, которые содержат РНК. Из двух пиримидинов, обычно обнаруживаемых в РНК, один — это цитозин (обнаруживается также в ДНК), а другой — урацил (2,6-оксипиримидин, в типичной ДНК не найден). Структура урацила представлена на рис. 19—3. Два пурина, обычно обнаруживаемые в ДНК, — аденин и гуанин, также найдены и в риботидах. В РНК комбинация из основания и сахара называется рибонуклеозидом, или *рибозидом*. Рибозиды соединены друг с другом фосфатами, присоединяемыми к сахару в положениях 3' и 5', как и в ДНК, так что рис. 19—9 может в такой же мере представлять и *полириботид*, если ввести кислород в каждое 2' положение (делая каждый сахар *D-рибозой*), а тимин заменить урацилом, одним из обычно встречаемых в РНК оснований. Наконец, следует указать, что РНК также

Таблица 19—1

НАЗВАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

| Нуклеиновая кислота | Обычное пиримидиновое (Пир) или пуриновое (Пур) основание | Пентоза | Нуклеозид | (Моно-) Нуклеотид с PO_4 на 5' |
|---------------------|---|------------------------------|-----------------|----------------------------------|
| | | 2'-дезоксид- <i>D-рибоза</i> | Дезоксирибозид | Дезоксириботид |
| ДНК | Цитозин (Пир) | | Дезоксцитидин | Дезоксцитидиловая кислота |
| | Тимин (Пир) | | Тимидин | Тимидиловая кислота |
| | Аденин (Пур) | | Дезоксиаденозин | Дезоксиадениловая кислота |
| | Гуанин (Пур) | | Дезоксигуанозин | Дезоксигуаниловая кислота |
| | | <i>D-рибоза</i> | рибозид | риботид |
| РНК | Цитозин (Пир) | | Цитидин | 5'-цитидиловая кислота |
| | Урацил (Пир) | | Уридин | 5'-уридиловая кислота |
| | Аденин (Пур) | | Аденозин | 5'-адениловая кислота |
| | Гуанин (Пур) | | Гуанозин | 5'-гуаниловая кислота |

абсорбирует ультрафиолетовые лучи с длиной волны 2600 Å, но может быть удалена из хромосомы воздействием *рибонуклеаз* (РНКаз).

В заключение следует указать, что типичные хромосомы содержат два типа нуклеиновых кислот, ДНК и РНК. Они обычно встречаются в комбинации с белком, образуя нуклеопротеиды (дезоксирибонуклеопротеид и рибонуклеопротеид), в которых эти кислоты встречаются как *полинуклеотиды* (полидезоксириботиды и полириботиды). Каждый полинуклеотид построен из *моонуклеотидов* (дезоксириботидов и риботидов, соответственно), состоящих, в свою очередь, из фосфатов, присоединенных в 5' положении *нуклеозидов* (дезоксирибозидов и рибозидов). Нуклеозиды в свою очередь состоят из пентозы (2'-дезоксид-Д-рибозы и Д-рибозы), присоединенной к пиримидину (обычно к цитозину или тимину и к цитозину или урацилу, соответственно) или к пурину (обычно аденину или гуанину).

Эта терминология частично приведена в таблице 19—1.

Хотя РНК в хромосомах не обладает ни должной количественной вариабельностью, ни постоянством, которого следует ожидать от обычных хромосомных генов, она обладает той же линейной организацией, что и ДНК. Более того, некоторые вирусы, содержащие в основном рибонуклеопротеиды (вирусы гриппа, полиомиелита, энцефалита, вирусы, которые, подобно вирусу табачной мозаики, поражают растения, и определенные вирусы бактерий), обладают генетическими свойствами, но не содержат ДНК.

Поскольку в типичной хромосоме химическим веществом, обладающим генетическими свойствами, служит скорее всего ДНК, а не белок, то вполне оправдана точка зрения, согласно которой в перечисленных вирусах роль химической основы генетической специфичности выполняет РНК, а не белок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эта глава представляет собой попытку пролить свет на химическую природу генетического материала. Поиски химических веществ со свойствами генетического материала привели к рассмотрению данных о белке, обнаруживаемом в хромосомах, однако имеющиеся данные не подтверждают предположения о том, что белок способен выполнять функции генетического материала. Было высказано предположение, согласно которому ДНК представляет собой генетический материал или, по крайней мере, тесно связана с генетическим материалом в хромосомах. Эта гипотеза основывается на следующих данных: сведения о локализации ДНК, ее количестве и распределении в митозе, мейозе, при оплодотворении; о полиплоидии и полинемии хромосом, о параллелизме между способностью ДНК поглощать ультрафиолетовые лучи и ее мутабельностью под влиянием ультрафиолетовых лучей; о сохранении молекулярной целостности ДНК и ее длинной линейной неразветвленной структуры. Предполагается также, что РНК может выполнять генетическую роль в определенных вирусах, не содержащих ДНК. Представлены некоторые детали химической природы ДНК и РНК.

Последующие главы посвящены дальнейшему обсуждению гипотезы, согласно которой ДНК (и в отдельных случаях РНК) либо является типичным генетическим материалом, либо intimately связана с ним. Конечная цель подобного обсуждения — определение химических единиц генетического материала, соответствующих генетическим единицам репликации, мутации, рекомбинации и функции.

- 19.1
- ДНК, а
- 19.2
- а) м
- б) ну
- в) п
- г) р
- 19.3.
- шего по
- 19.4.
- часть те
- 19.5.
- точки зр
- ствами?
- 19.6.
- вых луч
- 19.7.
- зывают с
- риал хро
- 19.8.
- что ДНК
- ческой о
- 19.9.
- ческой о
- 19.10.
- определе
- 19.11.

ЛИТЕРАТУРА

- E. Chargaff, 1960, *Acids and Bases of Nucleic Acids*, N. Davidson, F. Miescher, in *Biochemistry*, H. R. Potter, R. F. Stein, Amsterdam

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

19.1 Считаете ли Вы более простым допущение, согласно которому ДНК, а не белок, играет роль генетического материала? Почему?

19.2. Каково химическое различие между:

а) моновуклеотидом и полинуклеотидом?

б) нуклеотидом и нуклеозидом?

в) пиримидином и пурином?

г) рибозой и дезоксирибозой?

19.3. Напишите полную структурную формулу полириботида, имеющего последовательность оснований: аденин, урацил, гуанин, цитозин.

19.4. Дайте название тимичу как производному урацила. Какая часть термина «дезокситимидин» лишняя? Почему?

19.5. Какие доказательства Вы можете привести для подтверждения точки зрения, согласно которой вирусы обладают генетическими свойствами?

19.6. Как бы Вы приступили к измерению абсорбции ультрафиолетовых лучей хромосомной ДНК и хромосомной РНК?

19.7. Считаете ли Вы, что имеющиеся в настоящее время данные доказывают окончательно, что ДНК представляет собой генетический материал хромосом? Почему?

19.8. Каково Ваше мнение относительно гипотезы, предполагающей, что ДНК служит химической основой рекомбинации, а белок — химической основой функции генов?

19.9. Достаточно ли сложна ДНК, чтобы служить в качестве химической основы действия гена? Объясните.

19.10. Считаете ли Вы, что термину «хемон» можно дать приемлемое определение? Обоснуйте Ваше мнение.

19.11. Рассмотрите черты сходства и различия между ДНК и РНК.

ЛИТЕРАТУРА

- E. Chargaff, J. N. Davidson* (Eds). *The Nucleic Acids*, 1955. 2 vols. N. Y. Acad. Press.
1960, v. 3, N. Y. (Э. Чаргафф и Дж. Давидсон (Ред.). Нуклеиновые кислоты, т. 1 и 2. ИЛ, 1957, т. 3. ИЛ, 1962).
- J. N. Davidson, W. E. Cohn* (Eds). *Progress in Nucleic Acid Research*, 1963, 2 vols. N. Y.
- F. Miescher*. *On the Chemical Composition of Pus Cells*. Перевод в «Great Experiments in Biology», 1955, M. L. Gabriel and S. Fogel (Eds). Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall, p. 233.
- V. R. Potter*. *Nucleic Acid Outlines*. Minneapolis, 1960, v. I.
- R. F. Steiner, R. F. Beers Jr.* *Polynucleotides. Natural and Synthetic Nucleic Acids*, Amsterdam, 1961.

ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ
ДНК IN VIVO

В предыдущей главе были представлены данные, косвенным образом подтверждающие предположение о том, что ДНК служит химической основой хромосомного генетического материала. Там же была описана *первичная структура* ДНК, представляющая собой единичную длинную неразветвленную поляризованную цепь нуклеотидов. Если полимерная ДНК — это генетический материал, то следует ожидать, что он линейно дифференцирован, так что следующие друг за другом участки могут представлять собой различные гены. Такая дифференциация не может быть обусловлена ни дезоксирибозой, ни фосфатом, поскольку каждый из них присутствует в каждом нуклеотиде. Поэтому все различия в генетической информации по длине цепи ДНК, по-видимому, обусловлены входящими в ее состав органическими основаниями. Поскольку виды отличаются генетически, можно думать, что они отличаются между собой количеством ДНК или содержанием оснований.

В табл. 20—1 приведено содержание ДНК в геномах организмов различных типов. Как правило, чем выше место, которое организм занимает на эволюционной лестнице, тем больше ДНК содержит его геном. Возможно, правильнее говорить об увеличении содержания ДНК в геноме с увеличением числа функций, контролируемых генами. ДНК, выделенные из организмов разных видов, были подвергнуты гистохимическому анализу для определения составляющих их органических оснований. В табл. 20—2 показаны количества аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц) в процентах от общего количества оснований в экстракте, принятого за 100%. Видны значительные различия в относительной частоте встречаемости оснований. Наряду с организмами, относительно богатыми А и Т и бедными Ц и Г (морской еж), встречаются организмы, у которых А и Т значительно меньше, чем Ц и Г (микобактерии туберкулеза). Образцы ДНК, взятые от весьма далеких видов, содержат различные количества всех четырех оснований.

Таблица 20—1

СОДЕРЖАНИЕ ДНК В РАЗНЫХ ОРГАНИЗМАХ
(ЧИСЛО ПАР НУКЛЕОТИДОВ НА ГЕНОМ)

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| Человек, мышь, кукуруза | $5-7 \times 10^9$ |
| Дрозофила | 8×10^7 |
| <i>Aspergillus</i> | 4×10^7 |
| <i>Escherichia</i> | 1×10^7 |
| Бактериофаг Т4 | 2×10^5 |
| Бактериофаг Х 174 | $4,5 \times 10^3$ (однонитевая) |

Позволяют ли эти данные предполагать, что изменение последовательности оснований могут обуславливать генетические различия? Предположение о том, что различные последовательности одних и тех же оснований обеспечивают специфичность различных генетических единиц, согласуется с тем фактом, что цыпята, лосось и саранча, сильно отличающиеся генетически, имеют очень близкие соотношения оснований.

Таблица 20—2

НУКЛЕОТИДНЫЙ СОСТАВ ДНК РАЗНЫХ ОРГАНИЗМОВ

| | Аденин | Тимин | Гуанин | Цитозин |
|--|--------|-------|--------|---------|
| Человек (сперма) | 31,0 | 31,5 | 19,1 | 18,4 |
| Курица | 28,8 | 29,2 | 20,5 | 21,5 |
| Лосось | 29,7 | 29,1 | 20,8 | 20,4 |
| Саранча | 29,3 | 29,3 | 20,5 | 20,7 |
| Морской еж | 32,8 | 32,1 | 17,7 | 17,7 |
| Дрожжи | 31,7 | 32,6 | 18,8 | 17,4 |
| <i>Bacillus tuberculosis</i> | 15,1 | 14,6 | 34,9 | 35,4 |
| <i>Escherichia coli</i> | 26,1 | 23,9 | 24,9 | 25,1 |
| Вирус осповакцины | 29,5 | 29,9 | 20,6 | 20,3 |
| Колифаг T2 | 32,6 | 32,6 | 18,2 | 16,6* |

* 5-оксиметилцитозин.

Можно, правда, предложить другое объяснение, согласно которому эти виды представляют собой молекулярные полиплоиды, отличающиеся только числом молекул ДНК, которые они содержат. Однако эта гипотеза, по-видимому, не приемлема; известно, что хромосомная полиплоидия внесла незначительный вклад в эволюцию, по крайней мере, в эволюцию животных (главы 11, 18).

При проведении относительно грубых гистохимических анализов для определения общего количества ДНК в клетках с высоким содержанием ДНК следовало ожидать получения примерно одинаковых соотношений оснований у различных представителей одного и того же вида. Такое предсказание подтвердилось. Более того, найдено, что в различных нормальных и раковых тканях одного человека и у разных людей наблюдается одинаковое соотношение оснований. Тем не менее, ожидается, что геном содержит много молекул ДНК, отличающихся не только содержанием оснований, но и их последовательностью.

Различия между видами в величине соотношения $\frac{A+T}{G+C}$ (которое для микобактерии туберкулеза равно 0,4, а для морского ежа примерно 1,8) вполне согласуется с известными нам данными о химической структуре ДНК, так как сама нить ДНК не определяет ни тип, ни частоту встречаемости оснований по длине нити. Однако существует поразительное равновесие в количествах А и Т и Г и Ц в ДНК определенного вида (табл. 20—2). А так как в каждом виде $A=T$ и $G=C$, то вполне очевидно, что $A+G=T+C$; иными словами, в ДНК общее количество пуринов всегда равно общему количеству пиримидинов. Хотя это правило и оказалось справедливым для всех вышеперечисленных хромосомных ДНК, этот важный факт невозможно объяснить одной лишь первичной структурой ДНК. Тот факт, что первичная структура ДНК одинакова у всех организмов, позволяет предположить, что рассматриваемая закономерность определяется какими-то дополнительными общими структурными свойствами хромосомной ДНК.

Основу равенств $A=T$ и $G=C$ можно понять в свете исследований совершенно иного типа. Уже давно известно, что пучок рентгеновых лучей, проходя через вещества, изгибается, или преломляется. Если вещество, через которое проходят лучи, гетерогенно по структуре и ориентации молекул, то в преломлении пучка не удастся обнаружить какой-либо закономерности. Если же вещество состоит из макромолекулярных единиц (или) молекулярных субъединиц, которые пространственно располо-

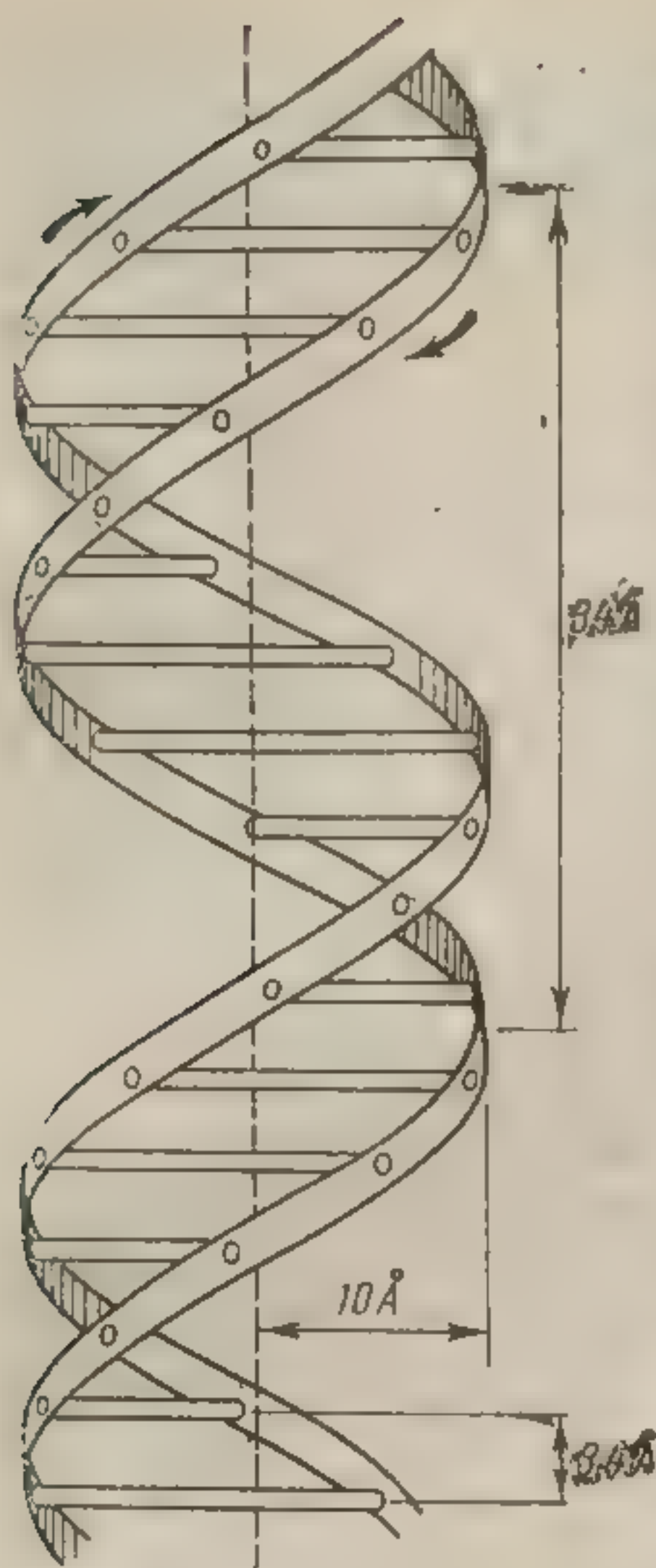


РИС 20-2.

Модель двунитчатой ДНК, имеющей спиральную конфигурацию по Уотсону и Крику

жены в определенном порядке, то проходящий через него пучок рентгеновых лучей дает *характерную дифракцию*. Характерная картина дифракции рентгеновых лучей может быть использована для идентификации единиц и субъединиц, которые повторяются в определенных интервалах пространства. Так, было показано, что каждый нуклеотид в цепи ДНК занимает 3,4 Å длины цепи; такую повторяемость нуклеотидов можно установить по характерной картине дифракции рентгеновых лучей, а именно по черным пятнам, локализованным симметрично вблизи верхнего и нижнего краев на фотографиях рис. 20—1.

Характер дифракции рентгеновых лучей был определен для ДНК различных видов. В ряде случаев ДНК не выделяли из ядер, тогда как в других случаях ее выделяли и освобождали от белка, входящего в состав нуклеопротеида. Промежутки между участками ДНК и, следовательно, характер дифракции зависят от степени гидрирования ДНК. Во всех случаях, когда ДНК соответствующим образом гидрирована, получены по существу одинаковые рентгенограммы, характерные для ДНК (рис. 20—1). Изучение этих рентгенограмм показало, что наряду с повторяющимися единицами, длиной в 3,4 Å, существуют другие повторяющиеся единицы, присутствие которых можно объяснить только тем, что ДНК *встречается обычно не в виде одной нити*. (В то же время методом дифракции рентгеновых лучей показано, что РНК обычно однонитчатая). Сле-

довательно, эти результаты ясно указывают на существование *вторичной структуры ДНК*, нормально обнаруживаемой во всех хромосомах. (О существовании вторичной организации ДНК какого-то типа можно было заключить на основании независимо установленных равенств А—Т и Г—Ц). Простейшее объяснение результатов, полученных Вилкинсом и соавторами при изучении дифракции, предложили Уотсон и Крик (1953а). Согласно их гипотезе, молекула ДНК *обычно состоит из двух нитей* (рис. 20—2); каждая нить представляет собой полинуклеотид; обе нити закручены относительно друг друга таким способом, что без свободного вращения их концов они не могут раскрутиться. Скручивание такого типа получило название *плектонемного* (т. е. подобного скручиванию нитей каната) в отличие от *паранемного* скручивания, которое позволяет разделить двух спиралей без вращения их концов (так могут быть разделены две пружины, прежде соединенные вместе «бок-в-бок»).

Модель Уотсона — Крика, объясняющая вторичную организацию макромолекул ДНК, предполагает наличие двойной спирали, в которой каждая нить *закручена направо* (т. е. по часовой стрелке). То же самое направление спирали обнаружено во вторичной структуре аминокислотных цепей *полипептидов*.

Основу двойной спирали составляют пентозо-фосфатные остовы каждой нити, тогда как относительно плоские основания лежат перпендикулярно продольной оси нити в центре спирали (на рис. 20—2 указана вертикальной прерывистой линией). Длина каждого витка остова составляет 34 Å. Каждый нуклеотид занимает 3,4 Å по длине нити; поэтому на полный



А



Б

РИС. 20-1.

Рентгенограммы соответствующим образом гидрированных нитей ДНК, показывающие так называемую β -конфигурацию, полученную при использовании натриевой соли ДНК (А) и при использовании литиевой соли ДНК (Б). Такая рентгенограмма позволяет провести наиболее полный анализ конфигурации молекулы

виток приходится 10 нуклеотидов, и каждый следующий нуклеотид отходит от предыдущего в горизонтальной плоскости под углом 36° (так что 10 нуклеотидов составляют 360° , необходимых для завершения полного витка).

Обе спирали удерживаются вместе с помощью химических связей между основаниями, расположенными на различных нитях. Было найдено, что эти две нити способны образовывать прочную двойную спираль, диаметр которой равен приблизительно 20 Å, только в том случае, если основания на различных нитях соединены в пары, каждая из которых включает один пиримидин и один пури́н. Соединение двух пиримидинов (имеющих однокольцевую структуру) образовало бы слишком короткий мост между углеводно-фосфатными остовами, тогда как соединение двух пуринов (имеющих двухкольцевую структуру) заняло бы слишком большое пространство. Кроме того, показано, что пури́н-пиримидиновое спаривание должно происходить либо между Ц и Г, либо между Т и А, так как только в этом случае между ними образуется максимальное количество стабилизирующих связей. Тип стабилизирующей связи, соединяющей основания в пары, называется *водородной связью*, или «Н-связью». Пары оснований, соединенных Н-связями (показанными прерывистыми линиями) представлены на рис. 20—3; указаны также водородные атомы, которые отсутствуют в случае соединения пар оснований с остовом. На верхней половине рисунка показаны пары Ц и Г — Ц. Следует указать, что в Ц — Г паре цитозин перевернут (слева направо) относительно положения, представленного на рис. 19—3. Образуются три Н-связи. Две связи образуются между NH_2 и О (6- NH_2 цитозина с 2-О гуанина; 2-О цитозина с 2- NH_2 гуанина) и одна между 1-Н цитозина и 1- NH гуанина. Пара Г : Ц идентична паре Ц : Г за исключением того, что в этом случае перевернутым основанием оказывается гуанин.

На нижней половине рис. 20—3 показан другой тип спаривания оснований Т : А (или А : Т), в котором Т и А, соответственно, повернуты относительно того положения, которое было показано на рис. 19—3 и 19—4. В этой паре образуются только две водородные связи, причем одна между 6-О тимина и 6- NH_2 аденина, а другая между 1- NH тимина и 1-Н аденина. Н-связь представляет собой слабую химическую связь по сравнению с С — С связью; однако вдоль двойной спирали их насчитывается так много, что в целом образуется паракристаллическая структура, весьма жесткая, даже в случае ее умеренной гидратации. Следует указать, что область, окружающая два спаренных нуклеозида, может быть разделена на две части относительно пентоз. Меньшая ее часть названа *малым желобком* (область, окружающая нижние части пар оснований, показанных на рис. 20—3), большая часть получила название *большого желобка* (область, окружающая их верхние части).

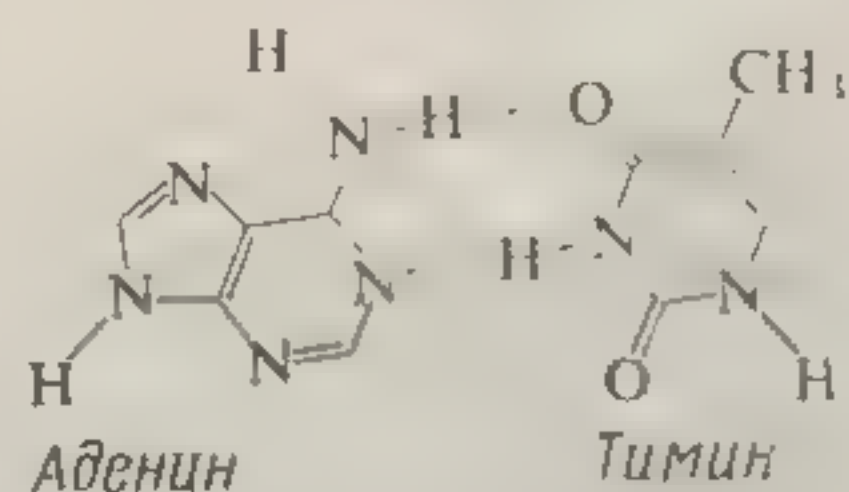
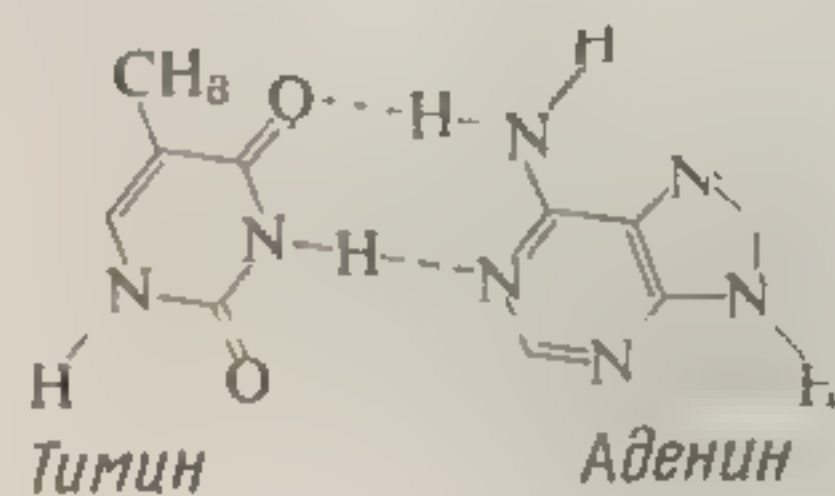
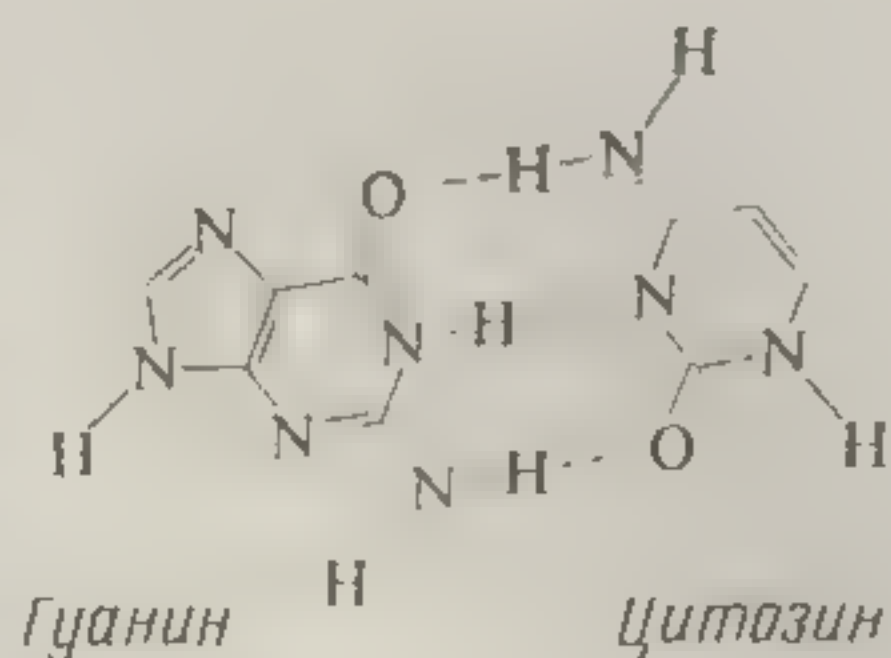
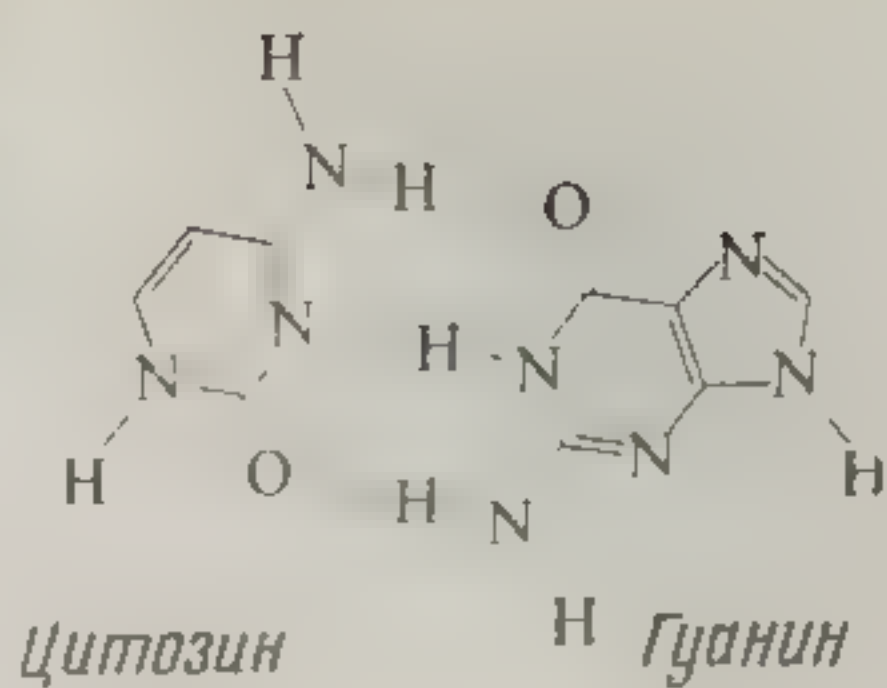


РИС. 20-3.

Образование пар оснований между отдельными нитями ДНК

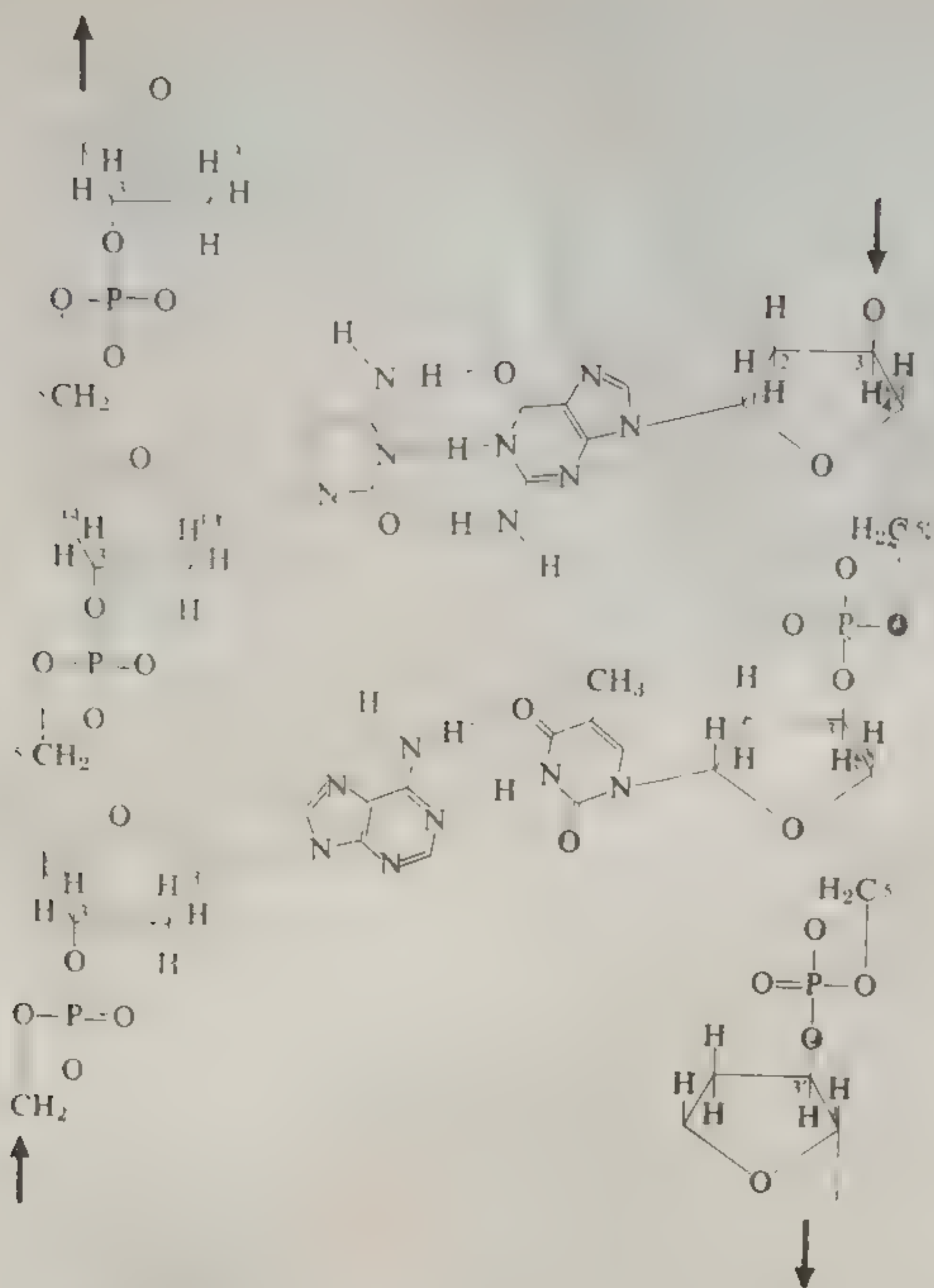


РИС. 20-4.

Противоположная направленность эфиро-фосфатных связей в двух нитях двойной спирали ДНК

Напомним, что конфигурация двойной спирали не определяет последовательности оснований по длине цепи. Однако следует также напомнить, что размеры пиримидинов и пуринов и их Н-связи определяют спаривание А одной цепи только с Т другой цепи, а также Ц с Г, в результате чего образуется двойная спираль определенного диаметра, нити которой скреплены друг с другом максимальным числом Н-связей. Так как А и Т всегда идут вместе (так же, как и Ц с Г), существование равенств А=Т и Ц=Г, обнаруженных при химическом анализе ДНК, по-видимому, приобретает определенный смысл в качестве прямого следствия особенностей вторичной структуры ДНК. Действительно, эти химические равенства обеспечили первое независимое подтверждение модели Уотсона — Крика, построенной первоначально на основании результатов, полученных при изучении диаграмм дифракции рентгеновых лучей и некоторых других соображений.

Как уже указывалось, для образования максимально возможного количества Н-связей между пурином и пиримидином необходимо, чтобы один из них был перевернут так, чтобы атомы, находящиеся в положении 1, были обращены друг к другу. Такое положение весьма существенно для ориентации двух цепей, соединенных друг с другом, как показано на рис. 20—4. Все основания в цепи справа располагаются обыч-

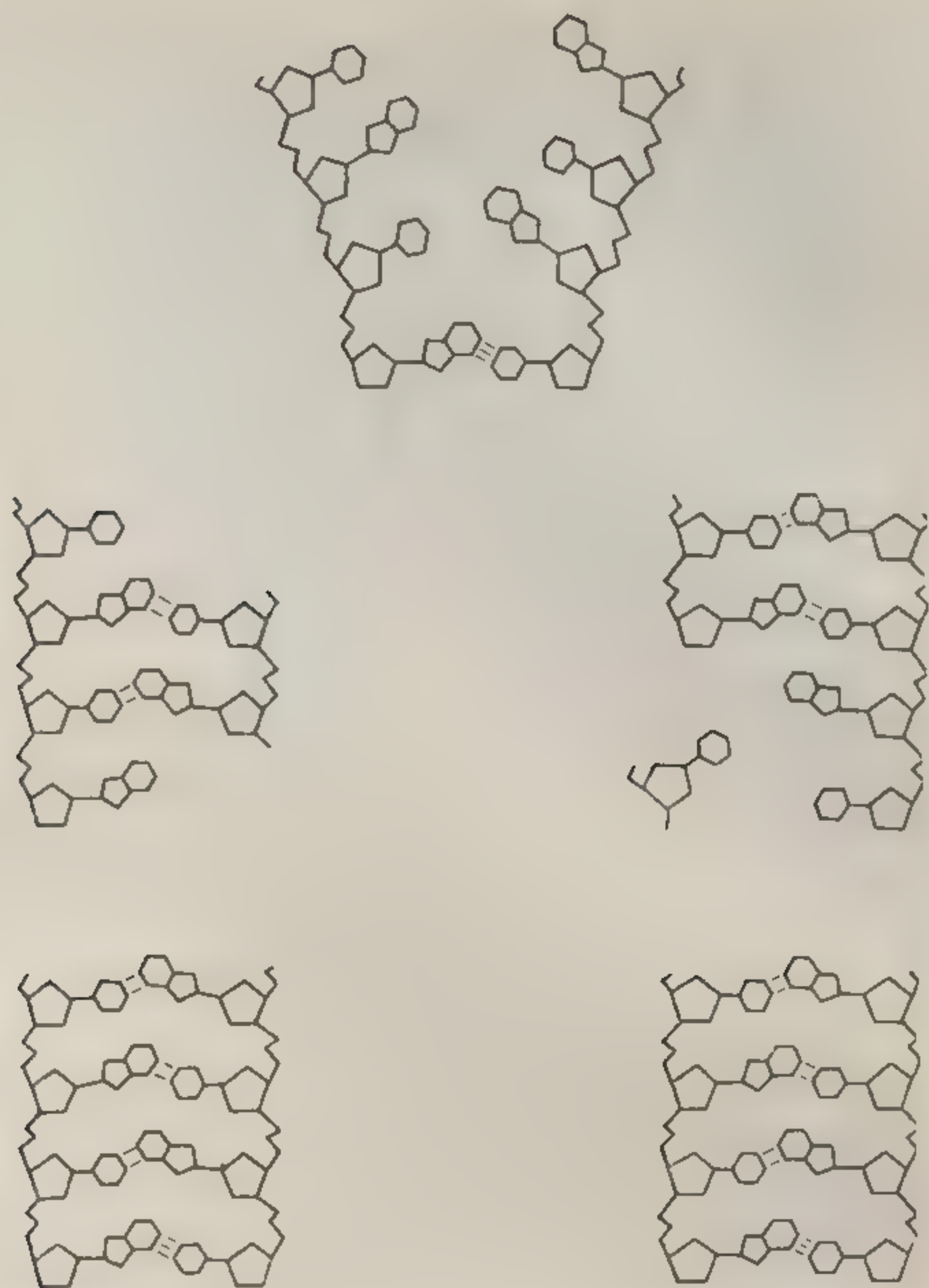


РИС. 20-5.

Схематическое изображение предполагаемого хода репликации ДНК после разделения нитей

ным путем, тогда как те, что расположены в левой цепи, перевернуты. Для соединения каждого основания с сахаром тем же способом молекулы сахара должны быть расположены, как показано на рисунке. Следует указать, что в правой части цепи связи PO_4 с сахаром читаются сверху вниз как 3'5', 3'5' и т. д.; если же читать тем же способом левую часть цепи, то связи читаются как 5'3', 5'3' и т. д. Иными словами, *две цепи двойной спирали идут в противоположных направлениях*, как показано стрелками.

Результаты изучения дифракции рентгеновых лучей, позволившие создать гипотезу о двойной спирали, не дают ответа на вопрос, вся ли ДНК в хромосомах двунитчатая или в определенных местах и в определенное время она может быть в однонитчатом состоянии. Такие данные указывают лишь на то, что довольно значительная часть хромосомной ДНК у широкого круга изученных организмов находится не в однонитчатом состоянии. С помощью химических анализов и дифракции рентгеновых лучей изучали также содержание и организацию ДНК в вирусах, поражающих бактерии. Данные, полученные для фагов T_2 и T_7 , например, полностью согласуются с моделью Уотсона и Крика, предполагающей двойную спиральную конфигурацию ДНК. Однако в зрелых частицах двух других более мелких вирусов (ф X 174 и S 13) ДНК найдена в однонитчатом состоянии. Об этом можно судить по наличию в неодинаковых количествах А и Т и соответственно Ц и Г, а также по отсут-

ственно характерной для вторичной структуры картины на фотографиях дифракции рентгеновых лучей.

В случаях, когда ДНК находится в конфигурации двойной спирали, можно считать, что *одна нить комплементарна другой*; следовательно, если нам известна последовательность оснований в одной нити, то можно точно определить состав другой нити. Так, если одна нить имеет последовательность оснований АТТЦГАЦ, другая нить должна содержать в соответствующей области ТААГЦТГ.

Если ДНК представляет собой генетический материал, то следует ожидать, что она реплицируется с такой же точностью, как и генетический материал. Последовательность оснований на одной цепи комплементарна последовательности на другой, поэтому сразу же возникает простое объяснение способа репликации двойной спирали, основанное на гипотезе Уотсона и Крика (G. Watson, F. Crick, 1953 b, c): две цепи сначала отделяются друг от друга и затем каждая из них строит комплементарную себе нить. Предложенное объяснение получило название *«гипотезы репликации ДНК посредством разделения нитей»*. В этом случае каждая нить служит шаблоном, матрицей для построения новой нити. Известно, что сложные поверхности (подобные скульптурам) могут быть точно скопированы, если сделать шаблон, который, в свою очередь, может быть использован для изготовления второго шаблона. Второй шаблон в этом случае окажется точной копией исходной конфигурации. В данном случае каждая из двух комплементарных нитей может рассматриваться как шаблон, или матрица, для другой нити. Одна или обе нити действуют в качестве шаблонов, на которых синтезируются комплементарные нити. На рис. 20—5 показана одна из вероятных схем репликации. В верхней части рисунка видно, как две нити начинают расходиться в результате разрыва Н-связей. В центре показаны две отдельные нити и отдельные нуклеотиды или их предшественники. Когда свободные нуклеотиды достигают отдельной цепи, их основания должны здесь связываться с помощью водородных связей. После того как два или более нуклеотидов соединятся с отдельной цепью, по-видимому, их должен связать между собой некий фермент, чтобы образовалась новая цепь. Внизу на рисунке показаны участки комплементарных цепей, синтез которых уже закончен.

М. Мезельсон и Ф. Сталь (M. Meselson a. F. W. Stahl, 1958) показали, что можно провести эксперименты, которые позволят проверить одновременно правильность гипотезы, предполагающей структуру ДНК в виде двойной спирали, и гипотезы о репликации цепей после их разъединения. Напомним, что каждое пиримидиновое или пуриновое основание, обычно найденное в ДНК, содержит соответственно два или четыре атома азота. Эти атомы обычно представляют собой *«легкий» азот N-14*. Можно вырастить бактерии в культуральной среде, содержащей азот только в форме более тяжелого изотопа, N-15, так называемого *тяжелого азота*. В результате почти вся ДНК, присутствующая в клетках, прошедших ряд генераций на этой среде, синтезируется с использованием тяжелого азота. Допустим также, что можно синхронизировать размножение бактерий, содержащих *«тяжелую» ДНК*. Что произойдет, если быстро отмытые бактериальные клетки поместить в культуральную среду, содержащую только *«легкий» азот*, и позволить им синхронно размножаться и далее? ДНК должна реплицироваться каждый раз, когда имеет место клеточное деление. Во время первой репликации ДНК две цепи, содержащие тяжелый азот, должны отделиться друг от друга, и каждая цепь будет служить шаблоном для синтеза комплементарной цепи, содержащей только *«легкий» азот*. В результате после одной репликации ДНК плотность молекул ДНК должна стать строго промежуточной между плотностью *«легкой»* и плотностью *«тяжелой» ДНК*. Для проверки этого предположения ДНК экстрагируется из *«тяжелых»*, а также из *«легких»*

рис. 2
Прове
кации
с испо
рова

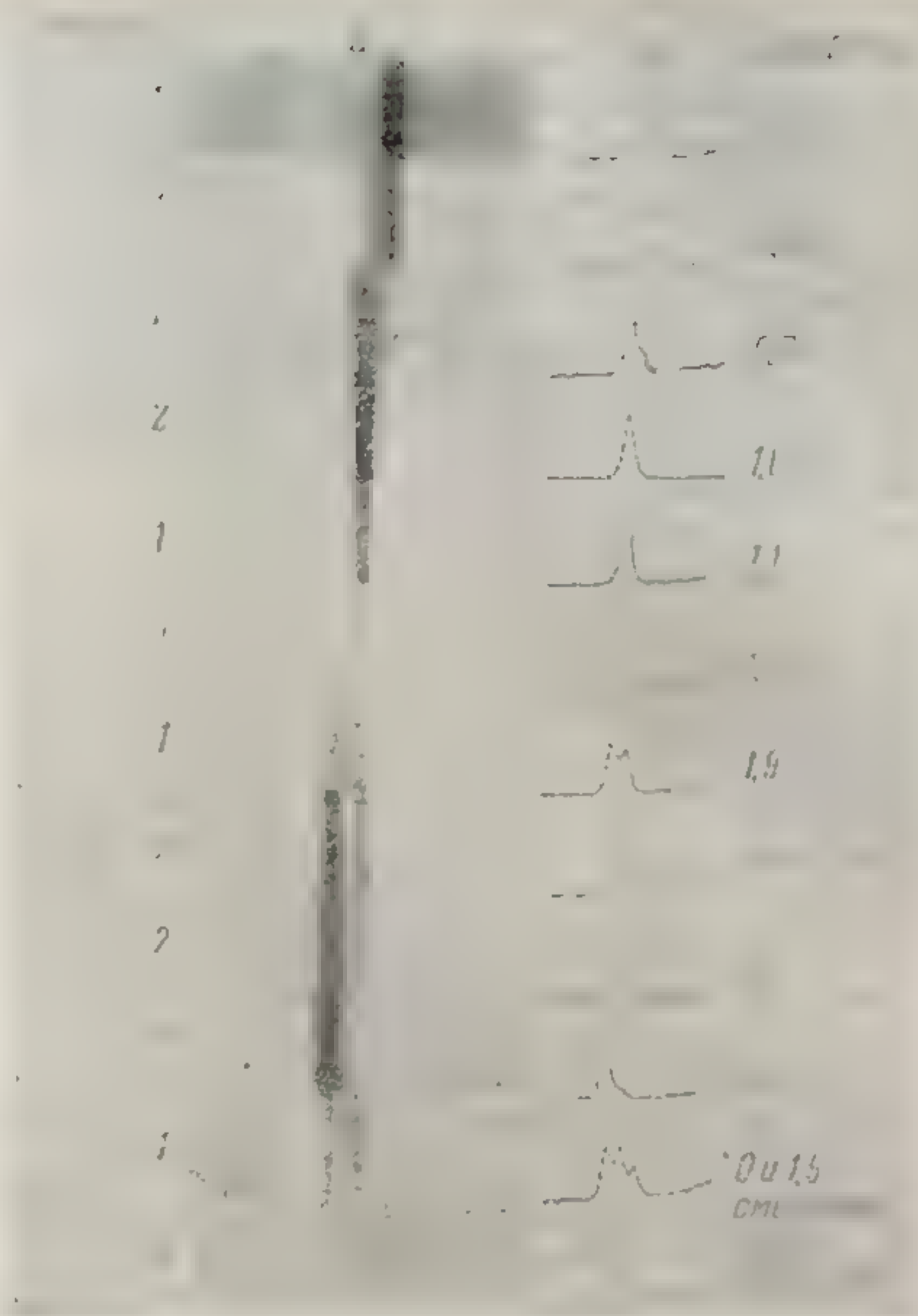
ДНК
содерж
ную
в течен
мени на
(N¹⁴) а
ультра
пределе
пробир
(Увелич
в напра
а на сер
глощен
полосам
ведены
циальн
Крайня
двух к
кадре со
ко тяже
лоса, яс
раздах
ветстве
ной дру
сой явля
щаяся м
лосами;
генерац
ДНК ги
ду тяже
1,9 гене
ставлена
другая
гибридн
кривую
(по М.
С т а л
S. 1958,

бактери
центриф
содержа
фугиро
высокая
ультра
ДНК за
Положе
щению
были на
и другая
личные
щены в
после ул
ДНК в
и «легко
даемому
ридной»
Что
В этом с
кая», та
цепи. Сл
образую
в то вре
ДНК, пр
в образца

РИС. 20-6.

Проверка гипотезы о «репликации после разделения цепи» с использованием центрифугирования в градиенте плотности.

ДНК экстрагирована из бактерий, содержащих тяжелую ДНК (меченую N^{15}). Бактерии выращивали в течение различных периодов времени на среде, содержащей легкий (N^{14}) азот. Экстракты подвергали ультрацентрифугированию для распределения ДНК в центрифужной пробирке согласно ее плотности. (Увеличение плотности на фото — в направлении направо). В колонке а на серии фотографий показано поглощение ультрафиолетовых лучей полосами ДНК. В колонке б приведены пики, записанные на специальных измерителях плотности. Крайняя справа полоса в нижних двух кадрах и полоса в верхнем кадре соответствуют наличию только тяжелой ДНК. Самая левая полоса, ясно различимая во всех образцах после 1,5 генераций, соответствует легкой ДНК. Единственной другой отчетливо видной полосой является полоса, располагающаяся между тяжелой и легкой полосами; она появляется после 1,0 генерации и представляет собой ДНК гибридную по плотности между тяжелой и легкой ДНК. После 1,9 генераций половина ДНК представлена легкой ДНК, тогда как другая половина характеризуется гибридной плотностью (см. кадр и кривую для смеси проб 0 и 1,9) (по М. Мезельсону и Ф. В. Сталю. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 1958, 44, 675)



бактерий. Эти экстракты, служащие контролем, подвергаются ультрацентрифугированию сначала отдельно, а затем вместе в жидкой среде, содержащей хлористый цезий. Примерно через 20 часов ультрацентрифугирования устанавливается градиент плотности, поскольку самая высокая концентрация хлористого цезия создается на дне пробирки для ультрацентрифугирования, а самая низкая — сверху. В такой пробирке ДНК занимает положение, соответствующее ее собственной плотности. Положение ДНК в градиенте плотности можно определить по поглощению ею ультрафиолетовых лучей с длиной волны 2600 Å. В опытах были найдены две отдельные полосы ДНК: одна, содержащая «тяжелую», и другая, содержащая «легкую» ДНК. Если ДНК экстрагировали в различные периоды времени после того, как «тяжелые» бактерии были помещены в среду, содержащую «легкий» азот, то полоса ДНК в пробирке после ультрацентрифугирования передвигалась из положения «тяжелой» ДНК в положение, строго промежуточное между положениями «тяжелой» и «легкой» ДНК (рис. 20—6). Такой результат строго соответствует ожидаемому при том условии, что ДНК действительно оказывается «гибридной» по плотности после одной репликации.

Что произойдет после еще одной дополнительной репликации ДНК? В этом случае две цепи гибридной ДНК должны разойтись, и как «легкая», так и «тяжелая» цепи должны построить «легкие» комплементарные цепи. Следовательно, после этой второй репликации половина вновь образующихся двойных цепей ДНК будет состоять из «легких» молекул, в то время как другая половина будет содержать гибридные молекулы ДНК, промежуточные между «легкими» и «тяжелыми». В самом деле, в образцах ДНК, взятых в более поздние интервалы времени, в пробирке

после ультрацентрифугирования вместо одной полосы, располагающейся в промежуточном положении, найдено две полосы, из которых одна занимает положение «гибридной» ДНК, а другая — положение «легкой» ДНК. Более того, следует указать, что время, необходимое для перехода от «тяжелых» к «гибридным» молекулам или от «гибридных» к половине «легких» и половине «гибридных» молекул, приблизительно равно периоду существования бактериальной генерации.

Хотя эти результаты и согласуются с гипотезой о репликации двунической ДНК посредством разделения цепей, они не исключают других возможных объяснений. Можно, например, утверждать, что двойная спираль увеличивается не в результате разделения цепей, сопровождающегося синтезом комплементарных цепей, а в результате добавления материала новой двойной цепи к концам исходной, двойной цепи. Проверить это объяснение можно двумя путями.

Если существующие первоначально «тяжелые» молекулы увеличились за счет добавления «легкого» материала к их концам, то линейно они должны представлять собой двойные цепи, которые последовательно составлены из «тяжелого» и «легкого» материала. Такие макромолекулы можно фрагментировать посредством звуковой вибрации на более мелкие сегменты, некоторые из которых должны быть полностью «тяжелыми», а другие — полностью «легкими». С помощью ультрацентрифугирования легко определить существование таких «легких» и «тяжелых» фрагментов и их положение в пробирке. Однако такой картины в опытах не наблюдается. ДНК сохраняет по существу то же положение, характерное для «гибридной» ДНК, независимо от того, фрагментирована она или нет.

Второй способ проверки предположения, согласно которому синтез идет на концах двойных цепей, может быть основан на следующих фактах: если *нативная двуническая ДНК* нагрета до соответствующей температуры (приблизительно до 98°C), то Н-связи разрываются и комплементарные нити разделяются. Двуническая ДНК с высоким соотношением $A + T / G + C$ становится однонической при более низких температурах, чем ДНК с низкой величиной этого соотношения. Это объясняется тем, что в ДНК первого типа значительно выше содержание $A - T$, каждая пара которых имеет на одну водородную связь меньше, чем $C - G$ пара. Поэтому требуется значительно меньшее количество энергии для разрыва меньшего количества водородных связей. Если соответствующим образом нагретую смесь быстро охладить, цепи остаются одноническими, образуя *денатурированную ДНК*. Такая тепловая денатурация с последующим быстрым охлаждением ведет к образованию отдельных нитей из двунической спирали, о чем свидетельствует утрата этой частью ДНК прежде свойственной ей дифракции рентгеновых лучей, характерной для многонитчатости. Сдвиг в сторону одноничатости сопровождается также увеличением абсорбционной способности в отношении ультрафиолетовых лучей с длиной волны в 2600 \AA примерно на 40%; следовательно одноническая ДНК *гиперхромна*. Ее плотность также несколько выше, чем у двунической ДНК. Если нагретую смесь, содержащую денатурированную ДНК, медленно охладить, то происходит спаривание оснований с образованием *ренатурированной ДНК*, для которой характерен *гипохромный эффект* и которая при изучении характера дифракции рентгеновых лучей дает картину, соответствующую двойной спирали.

Второй способ проверки гипотезы о синтезе ДНК на концах спирали основан на превращении «легких» и «тяжелых» молекул ДНК в одноничатые и определении положений двух типов отдельных нитей в пробирке после ультрацентрифугирования. Затем «гибридную» ДНК переводят в одноничатое состояние и ультрацентрифугируют. В полученном таким образом препарате были обнаружены только два основных компо-

нента,
гой —
с прове
möglich
ным по
цепей.

Под

ствленн
организ
этих э
вывод о
спираль
разделе

Несм

ставлена
мпами,
сущест
leg, 196
около 2
двойных
ных спи
мин-соде
ненной о
В клетка
друг с др

Рассм

представ
ставляет
нерешенн
цов, спос
века, при
(A. Bendi
ферментов
приводит
вают, что
вательно,
нити ДНК
дится оди
связаны с
молекулы
содержит
кислот в Д
и 10—15%
что, как п
часто оказ
в ДНК ле
По-видимо
прерывиста

Если эт
трудно пер
ряды амин
ными элеме
ферментов.

1) в изг

вольнo жес
2) в ме
нитей, веду

19 И. Гершков

нента, один из которых локализуется в положении «легкой» нити, а другой — в положении «тяжелой». Такой результат также не согласуется с проверяемой гипотезой. Проведенные тесты не только исключают возможность концевой синтеза ДНК у бактерий, но и служат дополнительным подтверждением гипотезы о репликации ДНК после разделения цепей.

Подобные эксперименты и с аналогичным результатом были осуществлены на одноклеточном растении *Chlamydomonas*, а также на высших организмах, включая человека. Однозначный ответ в результате всех этих экспериментов, по-видимому, позволяет сделать окончательный вывод о правильности гипотезы Уотсона — Крика в отношении двойной спиральной конфигурации хромосомной ДНК и ее репликации после разделения нитей.

Несмотря на то, что ядерная ДНК большинства организмов представлена в виде нуклеопротенда, связанного с гистонами или протаминами, ДНК бактерий и поражающих их вирусов, по-видимому, существует без соединений с основным белком (H. Ris и B. L. Chandler, 1964). В последнем случае ДНК-содержащие нити имеют диаметр около 25 Å. Обычные хромосомы, вероятно, полиинемны в отношении двойных спиралей ДНК (W. J. Peacock, 1963), хотя точное число двойных спиралей в хроматиде еще не установлено. Основная нить в протамин-содержащем спермии, состоящая из двойной спирали ДНК, соединенной с основным белком, по-видимому, имеет диаметр около 40 Å. В клетках, содержащих гистоны, две двойные спирали ДНК, связанные друг с другом и с гистоном, образуют нить толщиной примерно 100 Å.

Рассмотренные до сих пор данные не отвечают на вопрос о том, что представляют собой концы ДНК-полимера. Возможно, что ДНК представляет собой кольцевую молекулу, хотя это объяснение и оставляет нерешенной проблему разделения цепей при отсутствии свободных концов, способных вращаться. В ДНК, экстрагированной из спермы человека, примерно 0,1% «очищенного» материала состоит из аминокислот (A. Bendich и H. S. Rosencranz, 1963). Воздействие протеолитических ферментов на ДНК в тех точках, где она соединена с аминокислотами, приводит к ее выраженной деполимеризации. Эти результаты показывают, что длина ряда, образуемого аминокислотами, невелика и, следовательно, они должны локализоваться скорее внутри, а не на концах нити ДНК. Установлено, что в среднем на тысячу нуклеотидов приходится один ряд из трех аминокислот. Ряды аминокислот, по-видимому, связаны с фосфатами ДНК не в виде боковой цепи, а как составная часть молекулы. Таким образом, *остов нити ДНК, по-видимому, местами содержит короткие аминокислотные ряды*. Примерно около 33% аминокислот в ДНК представлено оксиминокислотами, серином и треонином, и 10—15% приходится на глутаминовую кислоту. Анализы показывали, что, как и ожидалось, аминокислотой, присоединяемой к фосфату ДНК, часто оказывается серин. Сообщалось также о наличии аминокислот в ДНК лейкоцитов человека, тимуса телят и вирусов коровьей оспы. По-видимому, ДНК хромосом слюнных желез личинки дрозофилы также прерывистая (D. M. Jeffensen, 1963).

Если эти результаты получают подтверждение, то важность их будет трудно переоценить, так как они показывают, что в состав ДНК входят ряды аминокислот, которые настолько коротки, что, будучи промежуточными элементами, могут быть устойчивыми к действию протеолитических ферментов. Такие аминокислотные группы могут участвовать:

- 1) в изгибе двойных спиралей ДНК (которые представляют собой довольно жесткие структуры), особенно там, где ДНК многократно скручена;
- 2) в механизме, посредством которого осуществляется разделение нитей, ведущее к началу репликации;

- 3) в разделении функциональных единиц ДНК;
- 4) в функционировании отдельных единиц ДНК;
- 5) в механизме кроссинговера;
- 6) в мутагенезе, определяемом агентами, способными поражать аминокислоты. (И. А. Рапопорт и Р. Г. Костяновский, 1959).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНК *in vivo* обычно существует в конфигурации двойной спирали, модель которой предложена Уотсоном и Криком. ДНК реплицируется после разделения нитей посредством образования комплементарных нитей.

У некоторых вирусов, например ϕ X 174 и ϕ S 13, ДНК однонитчатая. У бактерий и бактериальных вирусов ДНК не связана с белком.

Для обычных хромосом установлено, что основная нить толщиной 40 Å содержит протамин и одну двойную спираль ДНК; основная нить толщиной 100 Å составлена из гистона и двух двойных спиралей ДНК. Хроматида, вероятно, содержит ряд нитей толщиной 100 Å. Молекула ДНК, по-видимому, периодически прерывается короткими линейными аминокислотными группами.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

20.1. Можете ли вы сделать какие-либо выводы из того факта, что большинство изученных многоклеточных организмов содержит больше А + Т, чем Ц + Г?

20.2. Почему предполагают, что многие молекулы ДНК, содержащиеся в геноме, должны отличаться последовательностью оснований и содержанием различных оснований?

20.3. Сколько различных пар оснований встречается обычно в двойной спирали ДНК? Назовите их.

20.4. Если при рассмотрении с одного конца спираль оказывается правовращающейся, будет ли она также правовращающейся при рассмотрении с другого конца?

20.5. Если допустить, что синтез идет на концах двойной спирали ДНК, то какую картину следует ожидать в пробирке после ультрацентрифугирования ДНК, обработанной звуком, или ДНК, превращенной в однонитчатую?

20.6. Как можно доказать, что нагревание двойной спирали вызывает разделение цепи?

20.7. Когда ДНК бывает однонитчатой?

20.8. Двойная спираль ДНК имеет на одной нити последовательность оснований АТТАГЦА. Можете ли Вы допустить перестановку после разрыва остова в двух местах на этой одной нити? Объясните. Можете ли Вы допустить перестановку, если остов комплементарной цепи также разорван в тех же двух участках? Объясните.

20.9. Даны две двойные спирали, остовы которых разорваны в местах, указанных точками:

АТЦГ·ГЦАТ

АТ·ТАГ

ТАГЦ·ЦГТА

ТА·АТЦ

Назовите последовательность оснований, которая может встретиться после реципрокной транслокации между двойными спиралями.

20.10. Перечислите ошибки, допущенные на рис. 20—5.

20.11. М. Грин и М. Пина (1963) сообщили, что соотношение Г + Ц у ряда онкологических вирусов человека и животных одинаково и при-

том ниже, чем соотношение Г + Ц у вирусов, не вызывающих опухоли. Обсудите возможную связь такой аномалии с появлением и действием опухолеродных вирусов.

20.12. Укажите на рис. 20—4 малый и большой желобки двух пар нуклеотидов. Обсудите правильность этого рисунка.

ЛИТЕРАТУРА

- И. А. Рапопорт, Р. Г. Костяновский. Мутагенная активность некоторых ингибиторов холинэстеразы.—ДАН СССР, 1959, 121, 191.
- A. Bendich, H. S. Rosencranz. Some Thoughts on the Double-Stranded Model of Deoxyribonucleic Acid.—Progress in Nucleic Acid Res., 1963, 1, 219.
- F. H. C. Crick. Nucleic Acids.—Scient. Amer., 1957, 197, 188.
- H. Jehle, M. L. Ingerman, R. M. Shirven, W. C. Parke, A. A. Salyers. Replication of Nucleic Acids.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 738.
- V. Luzzati. The Structure of DNA as Determined by X-ray Scattering Techniques.—Progress in Nucleic Acid Res., 1963, 1, 347.
- M. Meselson, F. W. Stahl. The Replication of DNA *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1958, 44, 671.
- W. J. Peacock. Chromosome Duplication and Structure as Determined by Autoradiography.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 793.
- H. Ris, B. L. Chandler. The Ultrastructure of Genetic Systems in Prokaryotes and Eukaryotes.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1964, 28.
- N. Sueoka. Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in *Chlamydomonas reinhardtii*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 83.
- J. D. Watson, F. H. C. Crick. Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.—Nature, 1953a, 171, 737. Reprinted in «Classic Papers in Genetics», Peters J. A. (Ed.). Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall, 1959, p. 241.
- J. D. Watson, F. H. C. Crick. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid.—Nature, 1953b, 171, 964. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», Adelberg E. A. (Ed.). Boston, 1960, p. 125.
- J. D. Watson, F. H. C. Crick. The Structure of DNA.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1953c, 18, 123. Reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», Stent G. S. (Ed.). Boston, 1960, p. 193.
- См. Приложение IV и библиографию к нему.

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК IN VITRO

В предыдущих главах этой книги (стр. 18) уже высказывалось предположение о том, что ауторепликация — это характерное свойство генетического материала. Принимая во внимание косвенные данные, подтверждающие, что хромосомная ДНК представляет собой генетический материал, постараемся теперь получить как можно более подробные сведения о репликации двойной спирали ДНК. Данные о синтезе комплементарных нитей после разделения цепи ДНК (глава 20) можно считать доказанными. Однако еще не представлено доказательств относительно того, как осуществляется эта репликация. Ранее (см. рис. 20—5 и обсуждение на стр. 286) высказывалось предположение о существовании механизма с участием фермента, соединяющего нуклеотиды друг с другом, в результате чего образуется новая комплементарная нить.

Так как для линейного соединения нуклеотидов несомненно требуется энергия, то следует обсудить вопрос об источнике такой энергии. Существуют многочисленные данные, согласно которым значительная химическая энергия содержится в одном из рибонуклеотидов — *аденозинтрифосфате* (АТФ), т. е. рибозид-5'-трифосфате (рис. 21—1). Энергия, служившая для связывания двух фосфатов с аденозинмонофосфатом, становится доступной после того, как АТФ вступает в реакцию с другими нуклеотидами или кислотами и утрачивает два своих концевых фосфата, освобождая их в виде *неорганического пирофосфата*. Поскольку известно, что АТФ служит источником энергии для многих химических реакций в клетке, то можно предположить, что АТФ снабжает также энергией реакции, в результате которых происходит соединение отдельных дезоксирибозидов в нить ДНК во время репликации.

ДНК, выделенная из ядра и освобожденная от белка, еще сохраняет основные свойства, которые характерны для нее *in situ* (в живой клетке). Поэтому можно изучать синтез ДНК и вне этих условий. Что нужно экстрагировать из клеток, чтобы изучать синтез ДНК *in vitro*? Очевидно, следует использовать весь аппарат, нормально применяемый для этой функции клеткой. Существует точка зрения о продольном разделении цепи ДНК на нити, которые служат в качестве матрицы для синтеза ДНК; следовательно, экстракт должен содержать клеточную ДНК. В качестве источника энергии, необходимой для синтеза, к экстракту добавляется АТФ. Можно добавить также $MgCl_2$; известно, что ионы магния, Mg^{++} , активируют многие ферменты, поэтому предполагается, что они будут действовать таким же образом и на фермент, участвующий в образовании нити ДНК.

Как определить, что в экстракте происходит синтез ДНК? Любой неочищенный клеточный экстракт может содержать ДНКазу, которая способна деполимеризовать или вызвать иным способом деградацию ДНК гораздо быстрее, чем ДНК будет синтезироваться. Доказать реальность синтеза ДНК в случае, когда увеличения количества ДНК не наблюдается, можно, применив дезоксирибозид тимидин, у которого пиримидин мечен радиоактивным C^{14} , и добавив этот «горячий» реактив к экстракту. Если какое-либо количество радиоактивного тимидина включается в ДНК, то это свидетельствует о том, что реакция синтеза

идет, синтез. На клеточном уровне. Ученые ванием добавляю до оптимально. ДНК; мыми. пор, побирова обнару с 5 мл. Количес для его бовалос ность не может б ДНКазо. Этот не мене кислот образует тех или некоторые изучаемо. Реакция обычно в. Подобным и освобо уридина, основной жит рибозид-5'-трифосфата, соглас ботидов с. Если э то в *in vitro* видов, у которых фаты (с об. Предшеств те А. Ко.

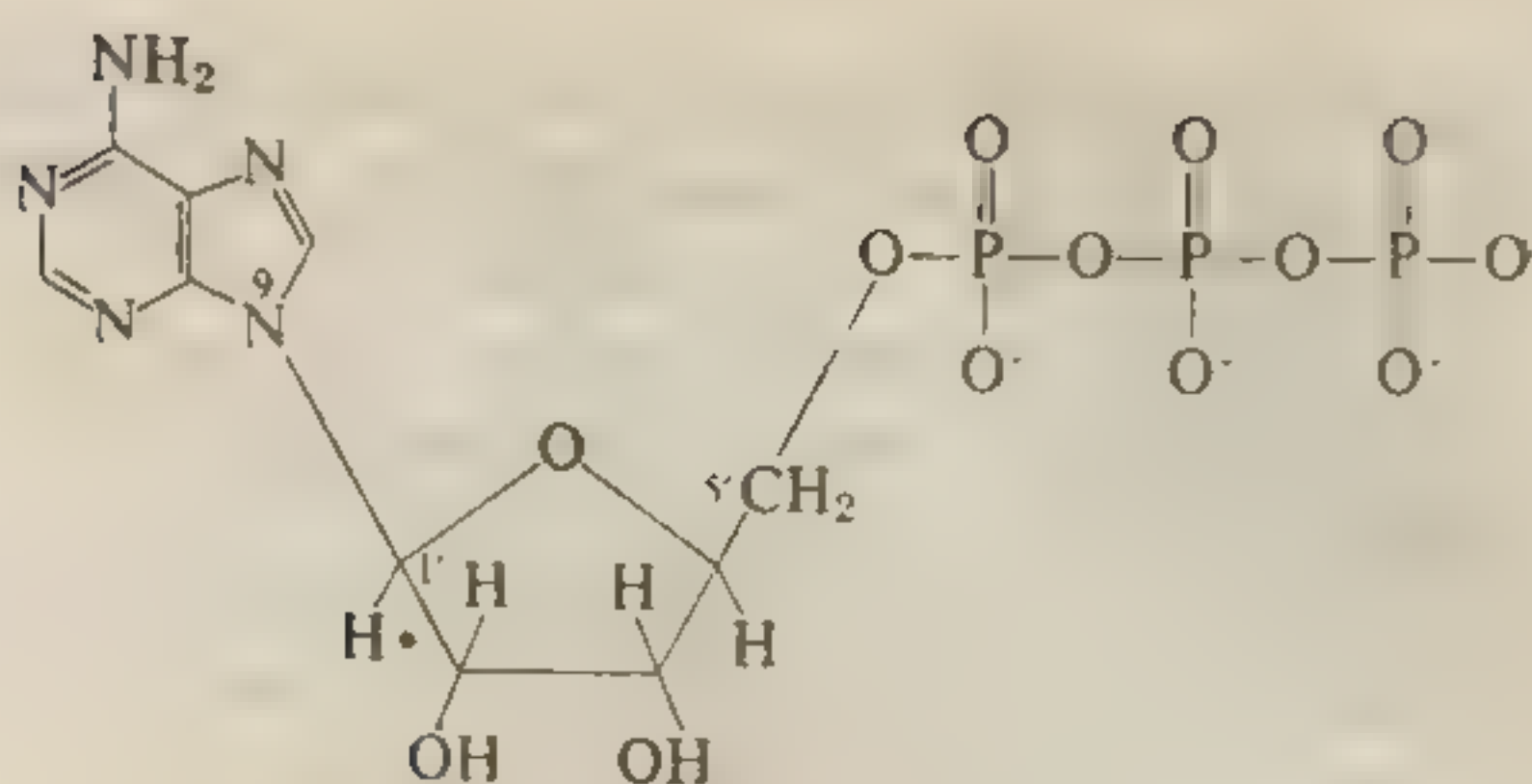


РИС. 24-1.

Аденозин-5'-трифосфат
(АТФ) (АФФФ)

идет, так как подобное включение в ДНК происходит только во время синтеза.

Наконец, следует получить экстракт из растущих и быстро делящихся клеток, так как, вероятно, именно они содержат максимальные количества необходимых для синтеза ДНК веществ.

Учитывая все эти факторы, осуществляют эксперимент с использованием экстракта из бактериальных клеток *Escherichia coli*¹. К экстракту добавляют АТФ, ионы магния и радиоактивный тимидин; рН доводят до оптимальной величины. По истечении инкубационного периода (примерно 30 мин.) рН смещают в кислую сторону для осаждения полимерной ДНК; отдельные дезоксирибозиды, т. е. мономеры, остаются растворимыми. Кислотонерастворимый осадок многократно промывается до тех пор, пока из осажженной ДНК не удаляются все загрязнявшие ее адсорбированные дезоксирибозиды. Затем осадок исследуется; в нем удается обнаружить лишь слабую радиоактивность (50 импульсов по сравнению с 5 миллионами импульсов в субстрате после добавления тимидина). Количество включенного в ДНК тимидина настолько ничтожно, что для его обнаружения с помощью обычного химического анализа потребовалось бы в 10 000 раз больше продукта. Тем не менее эта радиоактивность несомненно обусловлена включенным в ДНК тимидином, который может быть освобожден из осажженной ДНК только после ее обработки ДНКазой.

Этот результат не дает убедительных количественных данных; тем не менее конечным продуктом оказывается меченная C^{14} -тимидином, кислотонерастворимая, чувствительная к ДНКазе ДНК. Количество образуемого меченого материала может служить показателем эффекта тех или иных изменений в условиях эксперимента. Это позволило внести некоторые изменения в методику и достичь лучшего понимания природы изучаемой реакции.

Реакции, в результате которых образуются производные аденозина, обычно начинаются с АТФ, который оказывается одним из реагентов. Подобным же образом, с включением соответствующих трифосфатов и освобождением неорганического пирофосфата, образуются производные уридина, цитидина и гуанозина. Эти факты приводят к заключению, что основной единицей в образовании дириботидов или полириботидов служит рибозид-5'-фосфат, если он активирован и находится в форме рибозид-5'-трифосфата. Поэтому представляется вполне обоснованной гипотеза, согласно которой активным строительным блоком полидезоксириботидов следует считать дезоксирибозид-5'-трифосфат.

Если это так, то АТФ, добавленный к экстракту в случае экспериментов *in vitro*, может способствовать превращению различных дезоксирибозидов, уже присутствующих или добавленных к экстракту, в 5-трифосфаты (с образованием, например, C^{14} -тимидин-5'-трифосфата). Эта точка

¹ Предшествовавшие и последующие рассуждения основаны главным образом на работе А. Корнберга и его коллег.

зрения подтверждается при проведении синтеза ДНК *in vitro* с использованием меченого тимидин-5'-трифосфата ($T^* \text{ ФФФ}$) вместо меченого тимидина (T^*) + АТФ(АФФФ).

Чтобы подробнее изучить компоненты, существенные для синтеза ДНК, исходный экстракт, полученный из обработанных звуком бактерий, фракционируется и его белок концентрируется. В результате этой процедуры наблюдается увеличение синтетической активности примерно в 4000 раз. Эти и другие данные ясно показывают, что присутствие белкового катализатора-фермента *E. coli* ДНК-полимеразы (или ДНК-дупликазы) весьма существенно для этой реакции синтеза.

Концентрирование ДНК-полимеразы *E. coli* позволяет резко увеличить выход ДНК (конечное количество минус начальное количество). Однако такое увеличение можно получить только в том случае, если 5'-трифосфаты всех четырех дезоксирибозидов, обычно обнаруживаемых в ДНК, добавлены в инкубационную смесь. Дезоксирибозид-5'-дифосфаты, так же как и рибозид-5'-трифосфаты, в этой системе не активны. Таким образом для увеличения выхода синтезированной ДНК обязательны следующие компоненты:

- 1) уже сформированные молекулы ДНК с высоким молекулярным весом;
- 2) ионы магния;
- 3) ДНК-полимераза.

Уже сформированная ДНК с высоким молекулярным весом может быть получена из растений, животных, бактерий или вирусов. Такие же экстракты, в которых может быть осуществлен синтез ДНК, могут быть приготовлены из других бактерий, тимуса телят и различных тканей животных.

ЭКСТЕНСИВНЫЙ И ОГРАНИЧЕННЫЙ СИНТЕЗЫ

Используя препараты *E. coli*, можно получить *экстенсивный синтез* ДНК, в результате которого образуется количество ДНК, в 20 раз или более превосходящее исходное количество. Следовательно, в этом случае не менее 95% ДНК, присутствующей в конце эксперимента, должно быть синтезировано из трифосфатов, добавленных в субстрат, причем экстенсивный синтез идет до тех пор, пока не истощатся запасы какого-либо из четырех трифосфатов. Одна молекула неорганического пирофосфата освобождается при включении каждой молекулы дезоксирибозидов в ДНК.

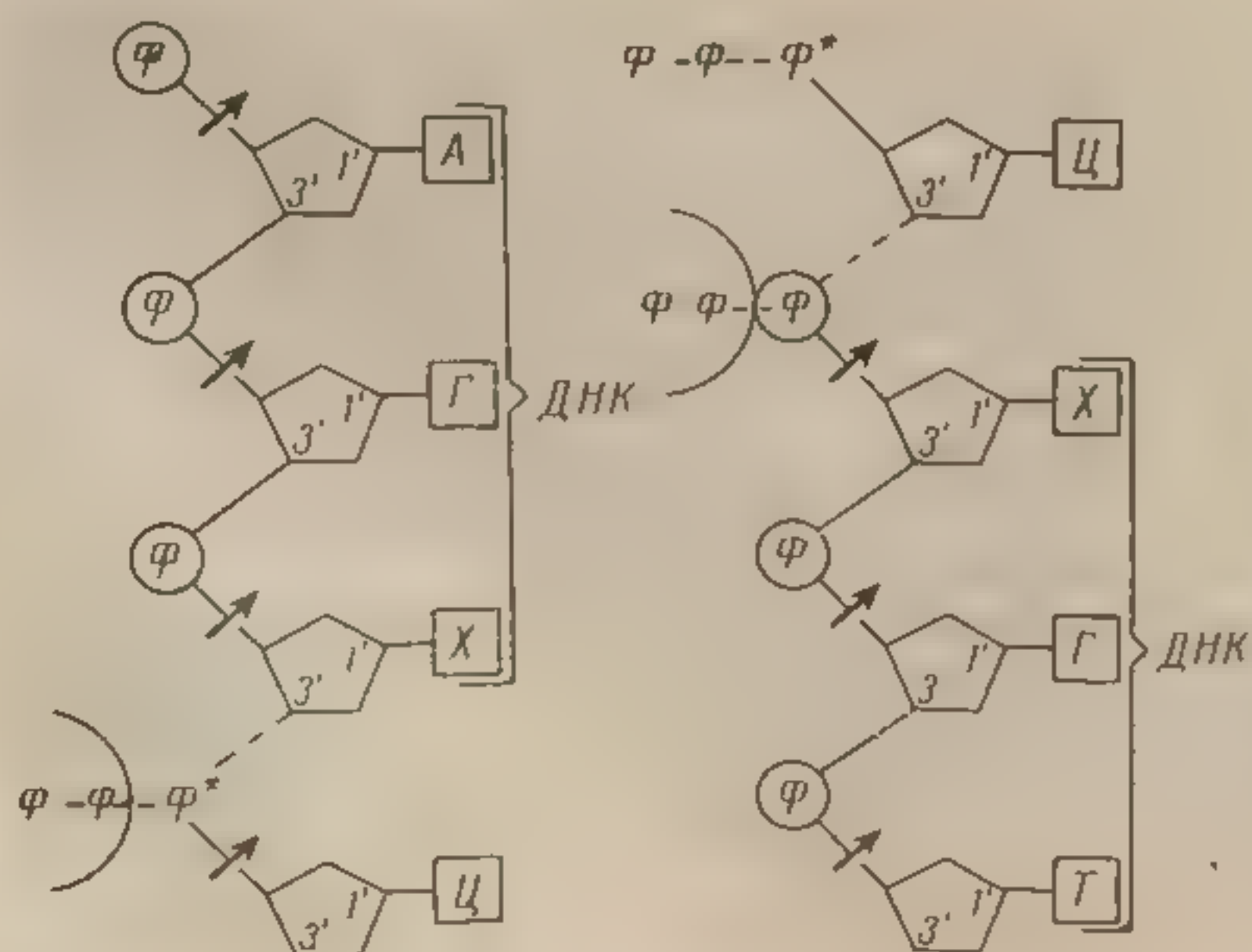


РИС. 21-2.

Увеличение затравочной нити ДНК в нуклеозидном конце (слева) и нуклеотидном конце (справа).

Стрелки показывают 5'-положения, в которых происходят разрывы, вызываемые действием ДНКазы микрококка и фосфодиастеразы селезенки

Если в качестве субстрата добавлен только один из дезоксирибозид-5'-трифосфатов, экстенсивного синтеза ДНК не наблюдается, хотя можно проследить некоторое включение этого нуклеотида в цепь ДНК в процессе так называемой *ограниченной* реакции синтеза. С помощью какого механизма присоединяется нуклеотид к предсуществующей нити ДНК? В этом случае уже присутствующая ДНК должна обеспечить точку линейного присоединения вновь формирующейся ДНК, действуя подобно *затравке*. Допустим, что единственным трифосфатом, добавленным к субстрату, оказался дезоксицитидин-5'-трифосфат, внутренний фосфат которого мечен P^{32} ($dЦФ^*ФФ$). Два возможных способа удлинения цепи ДНК показаны в левой и правой частях рис. 21—2 (цепь ДНК, выполняющая роль затравки, заключена в скобки). Нить затравки имеет два конца: *нуклеотидный конец* (верхняя часть рисунка), к которому присоединяется пирофосфат, как показано на рисунке справа, и *свободный 3' — ОН нуклеозидный конец* (нижняя часть рисунка). (Удаление сахара и основания путем одного разрыва в положении 5' ведет к удалению нуклеозида на нуклеозидном конце и к удалению нуклеотида на нуклеотидном конце цепи.) В левой части рисунка показан $dЦФ^*$, добавленный к нуклеозидному концу с помощью 3' связи между $Ф^*$ и сахаром в конце цепи с отщеплением $Ф — Ф$ от $dЦФ^*ФФ$. Рисунок справа показывает $dЦФ^*ФФ$, добавленный к нуклеотидному концу цепи путем присоединения в положение 5' конца нуклеотида с высвобождением пирофосфата. Короче, цепь ДНК может быть удлинена за счет добавления нуклеотида либо в положение 3' нуклеозидного конца, либо в положение 5' нуклеотидного конца.

Выбор между этими двумя альтернативами позволяет сделать следующий эксперимент. Продукт ограниченной реакции обрабатывается сначала *ДНКазой из микрококков* для усиления действия другого фермента, *фосфодиэстеразы селезенки*, который также добавлен в субстрат. Этот фермент вызывает распад ДНК путем разрывов цепи во всех 5' положениях, в результате чего образуются дезоксирибозид-3'-монофосфаты. Точки разрывов указаны на рис. 21—2 стрелками. Если увеличение цепи идет согласно показанному на диаграмме в правой части рисунка, то радиоактивный P^{32} должен быть обнаружен в фосфате, присоединенном к дезоксицитидину и, следовательно, P^* не должен быть частью 3'-дезоксириботидов А, Т или Г. С другой стороны, если присоединение происходит в положении 3' нуклеозидного конца цепи, то, как видно на рисунке слева, P^* не должен встречаться в неорганических фосфатах, но должен иногда появляться в других дезоксирибозид-3'-монофосфатах, кроме дезоксирибозидов, содержащих Ц. В эксперименте получены результаты, соответствующие последнему предположению: P^* отсутствует в неорганическом фосфате, но присутствует во всех четырех типах дезоксирибозид-3'-монофосфатов.

Для дополнительной проверки этих данных, согласно которым цепь ДНК нарастает в положении 3', потребовалась обработка того же продукта другим ферментом, *диэстеразой змеиного яда*. Этот фермент переваривает ДНК, вызывая разрыв связи между фосфатом и сахаром в поло-

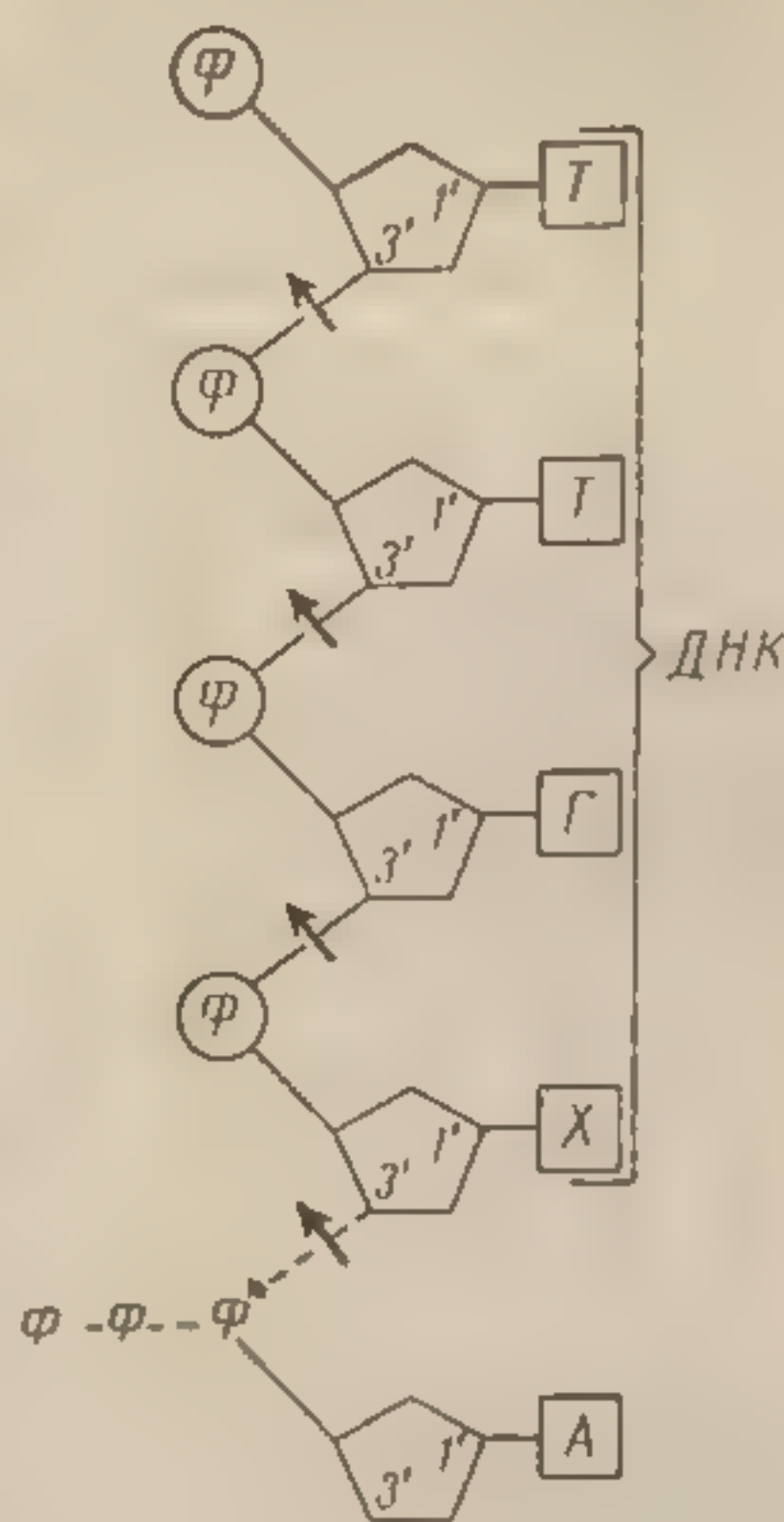


РИС. 21-3.

Распад затравочной нити ДНК, увеличенной за счет добавлений в нуклеозидном конце, под действием диэстеразы змеиного яда.

Разрывы в положениях 3' (показаны стрелками) происходят последовательно, начиная с нуклеозидного конца

жении 3'. Разрывы начинаются на нуклеозидном конце цепи и распространяются по направлению к нуклеотидному концу. ДНК переваривается, постепенно распадаясь на дезоксирибозид-5'-фосфаты, как показано стрелками на рис. 21—3.

После обработки таким способом продукта ограниченной реакции удалось показать, что, как и ожидалось, почти вся радиоактивность исчезала из цепи даже в том случае, когда лишь незначительная часть ДНК подверглась действию фермента. Результаты других опытов свидетельствуют о том, что продукт ограниченной реакции представляет собой ДНК, к нуклеозидному концу которой присоединен один или несколько дезоксирибонуклеотидов. Кроме того, получены данные, подтверждающие предположение о том, что именно в положении 3' происходит нарастание цепи ДНК при увеличении ее общего количества в процессе ограниченной реакции.

СВОЙСТВА СИНТЕЗИРОВАННОЙ ДНК

Тот факт, что удлинение цепи ДНК может происходить *in vitro* в результате присоединения любого из четырех обычных дезоксирибозидов к нуклеозидному концу, согласуется с нашими представлениями о независимости первичной структуры ДНК от последовательности оснований. Существует ли какое-либо другое доказательство того, что ДНК, синтезированная *in vitro*, имеет свойства ДНК, синтезированной *in vivo*?

Рассмотрим некоторые физические свойства препаратов ДНК, состоящих не менее чем на 90% из продукта, синтезированного *in vitro*. Такие физические свойства этой ДНК, как скорость седиментации и вязкость, подобны свойствам ДНК, выделенной из тимуса телят. На этом основании можно заключить, что изучаемый продукт имеет высокий молекулярный вес (около шести миллионов) и обычно не одностранный. В подтверждение последнего заключения найдено, что макромолекулярная структура продукта, полученного *in vitro*, разрушается при нагревании в течение 10 мин. при 100° С, как и следовало ожидать, если допустить, что в результате такой обработки образуются отдельные цепи денатурированной ДНК, которые изгибаются с образованием компактных, беспорядочно скрученных структур. Подобно ДНК тимуса, продукту ферментативного синтеза свойственно увеличение поглощения ультрафиолетовых лучей после обработки панкреатической ДНКазой.

Если синтез *in vitro* идет тем же путем, что и *in vivo*, то следует ожидать, что одностранный ДНК будет служить лучшей затравкой при синтезе *in vitro*, чем двустранный ДНК. Одностранный ДНК, выделенный из вируса ф X 174, оказалась замечательной затравкой, а подвергнутая действию высокой температуры ДНК представляет собой гораздо лучшую затравку, чем необработанная. Более того, препараты, содержащие наиболее активную ДНК-полимеразу, не способны работать с двустранным ДНК-затравкой, если она предварительно не подверглась воздействию нагревания или ДНКазы. ДНК, полученная в процессе экстенсивного синтеза, ведет себя как двустранный, но отличается от нативной двустранный ДНК своей разветвленностью, о чем можно судить по электронным микрофотографиям. Кроме того, она легко может быть ренатурирована после нагревания или щелочной денатурации. Следовательно, разделение нитей в системе *in vitro*, по-видимому, неполное.

Приведенные результаты дают возможность заключить, что по своим физическим свойствам ДНК, синтезированные *in vitro* и *in vivo*, весьма схожи, хотя и не идентичны. В синтезе несомненно участвуют одностранные цепи, которые становятся двустранными, по-видимому, с помощью водородных связей.

Уд
особен
зуют д
собно
сущес
образ
в сист
сущес
тарны
и пур
встреч
в ДНК
вания
мому,
5-мети
вывать
(котор
терных
компле
обеспеч
с А. П
фосфат
При
уридин
и dГФФ
может

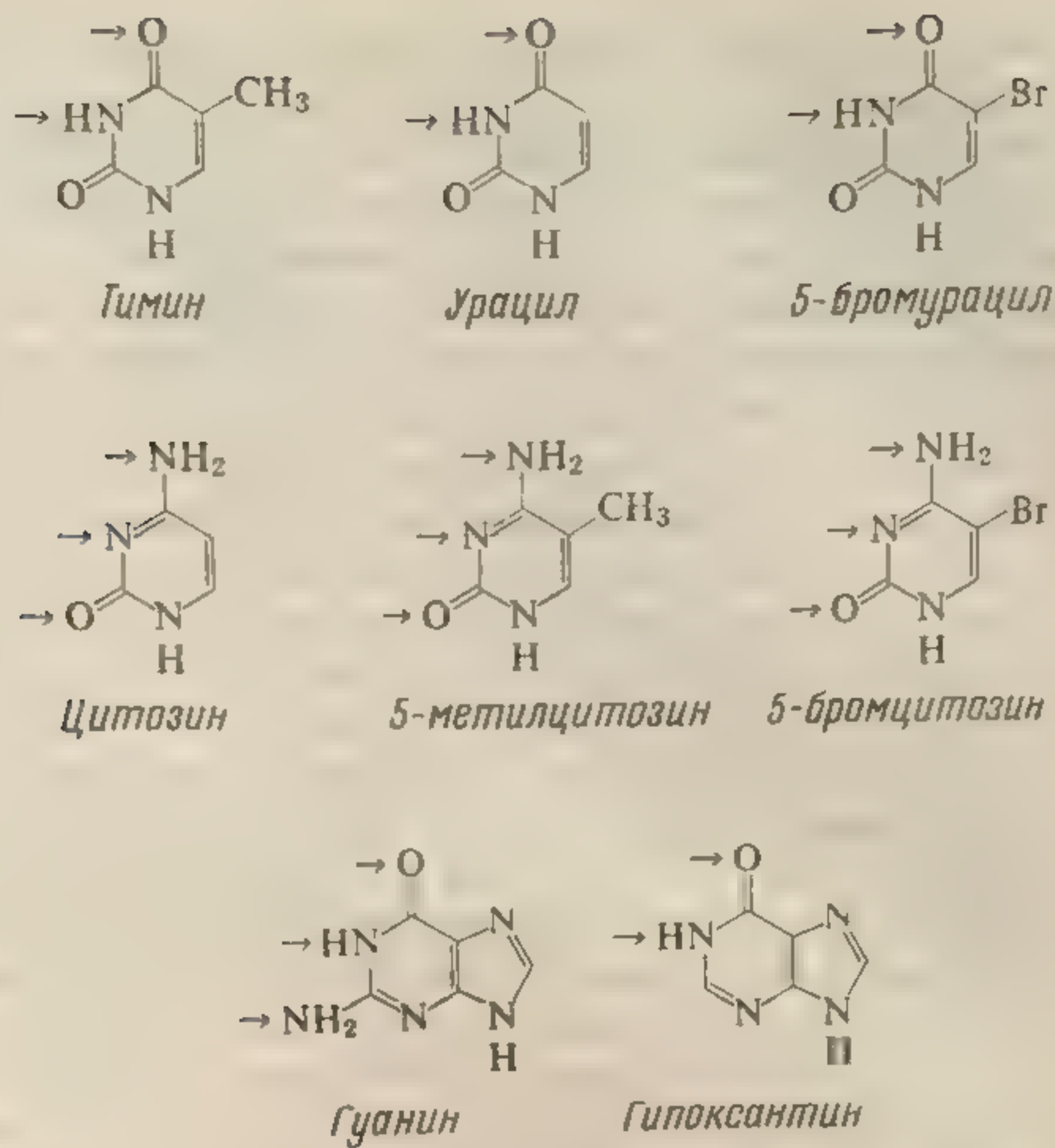
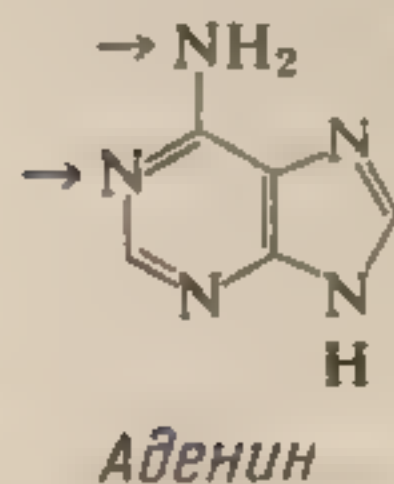


РИС. 21-4.

Различные основания, используемые при синтезе ДНК *in vitro*.

Стрелками указаны группы, способные образовывать типичные Н-связи



Удалось также детально изучить химические и физико-химические особенности ДНК, синтезированной *in vitro*. Если отдельные нити образуют двойные цепи путем образования комплементарных структур, то способность образовывать комплементарную цепь должна зависеть от присутствия в субстрате пуриновых и пиримидиновых оснований, могущих образовать соответствующие водородные связи с основаниями внесенной в систему ДНК. Иными словами, в процессе экстенсивного синтеза предсуществующая ДНК должна служить матрицей для синтеза комплементарных нитей ДНК. На рис. 21—4 показаны некоторые пиримидиновые и пуриновые основания, которые в ДНК обычно не встречаются или встречаются редко, а также четыре основных типа, которые встречаются в ДНК достаточно часто. К необычным или редко встречающимся основаниям относятся: урацил и 5-бромурацил (каждый из которых, по-видимому, способен давать то же количество водородных связей, что и тимин), 5-метилцитозин и 5-бромцитозин (каждый из которых способен образовывать то же количество водородных связей, что и цитозин) и гипоксантин (который имеет два из трех участков для образования Н-связей, характерных для гуанина). Основание А в одонитчатой затравке определяет комплементарное себе основание в силу того, что такое основание способно обеспечить необходимое количество участков для связывания Н-связями с А. Поэтому, например, следует ожидать, что тимин в тимидин-5'-трифосфате может быть замещен урацилом или 5-бромурацилом.

При использовании субстрата, содержащего 5'-трифосфат дезоксиуридина (или же 5-бром-или 5-фтордезоксиуридин), *dЦФФФ*, *dАФФФ* и *dГФФФ*, синтез ДНК идет нормально. Подобным же образом цитозин может быть замещен также 5-метилцитозином, 5-бромцитозином или

5-фторцитозинном. С другой стороны, при замене гуанина гипоксантином синтез ДНК не идет так, как при других упоминавшихся заменах. Это соответствует только что выдвинутой гипотезе: ведь гипоксантин имеет только два участка, необходимых для образования водородных связей, вместо трех, имеющих у гуанина. Кроме того, оказалось, что ни урацил, ни 5-бромурацил, ни 5-фторурацил не способны заместить Ц, А или Г соответственно в $dЦФФ$, $dАФФ$ или $dГФФ$. Подобным же образом, 5-метил-, 5-бром- и 5-фторцитозины специфически замещают цитозин; гипоксантин же замещает только гуанин. Гипоксантин имеет те же способности к образованию водородных связей группы, что и тимин; однако он не замещает тимин, вероятно по той причине, что пара А-гипоксантин, составленная из двух пуринов, займет слишком большое пространство, нарушающее правильную конфигурацию двойной спирали. Эти результаты подтверждают гипотезу, согласно которой нормальный синтез ДНК *in vitro* зависит от образования комплементарных пуринопиримидиновых пар — А с Т, Ц с Г — подобно тому, что происходит *in vivo*.

ДНК, синтезированная *in vitro* из обычных четырех дезоксирибозид-5'-трифосфатов, может быть подвергнута химическому анализу. Оказалось, что в синтезированной *in vitro* ДНК $A = T$ и $C = G$, точно так же, как это имеет место в ДНК, синтезированной в естественных условиях; это справедливо даже для тех случаев, когда относительные концентрации четырех трифосфатов в субстрате варьируют в широких пределах. В «синтетической» ДНК общее количество пиримидинов равно общему количеству пуринов, независимо от того, синтезировались ли умеренные количества ДНК или большие. Более того, свойственная затравке величина $\frac{A+T}{G+C}$ полностью воспроизводится в синтезированном продукте (см. табл. V—1 в Приложении V). Синтезированный продукт в этом отношении представляет собой копию затравки-матрицы. Это положение блестяще иллюстрируется следующим экспериментом. После продолжительного периода инкубации всех обычных компонентов, кроме затравки, спонтанно образуется линейный дезоксириботидный полимер, содержащий только А и Т. Если такой полимер использовать затем в качестве затравки, то даже если все четыре обычных трифосфата присутствуют в субстрате, наблюдается интенсивный синтез материала, содержащего только А и Т и не содержащего даже следов Ц и Г (снова см. табл. V—1 в Приложении V).

Ранее уже указывалось, что на каждый нуклеотид, добавленный к концу цепи ДНК, освобождается одна молекула неорганического пирофосфата, $ФФ$. Показано, что при добавлении к обычному синтезирующему ДНК комплексу избытка $ФФ$ (примерно в 100 раз больше по сравнению с концентрацией трифосфатов) синтез подавляется примерно на 50%. Этот факт позволяет предполагать обратимость синтеза ДНК *in vitro*.

Ранее также упоминалось, что в случае ограниченной реакции $dЦФ^*(ФФ)$ может быть присоединен к цепи, кончающейся любым из четырех типов нуклеотидов ($dЦФ$, $ТФ$, $dАФ$ и $dГФ$). Это, однако, не означает, что $dЦФ^*$ линейно соединяется с каждым нуклеотидом с одинаковой частотой или что любой нуклеотид соединяется со всеми другими с равной частотой. Показано, что при ограниченной реакции добавление нуклеотидов к концу цепи не происходит случайно: эта реакция включает, по-видимому, достройку более короткой нити двойной спирали, причем природа присоединяемого нуклеотида определяется обычным способом, с помощью основания, присутствующего в более длинной цепи. Другими словами, более короткая нить действует как затравка, а более длинная — как матрица.

Каково
в про
выполн
сегмен
так, то
образу
четыре
динукл
одна из
сущест
в дину
делить
фатов,
ный R^{32}
сивного
положен
Прилок
синтези
кокков
ний фер
членя
фосфат (
лежащим
ДНК. В
мости $Ф$
когда $Ф$
об относ
Если вся
случае р
тельную
Таком
neighbor
зованием
ная из ча
обнаружи
 $C = 0,185$
ных пар о
 $Ф X 174$ и
как будет
нию комп
 $0,242 C$ и
мым. Если
то после
и $C = G$
 $1/2 (0,328$
подтвержда
Можно
раз исполь
соседние н
комбинаций
чаемости в
 $TC; 0,052$
ближайший
Если комп
и нить мат

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДИНУКЛЕОТИДОВ

Каково линейное расположение нуклеотидов в ДНК, синтезированной в процессе экстенсивной реакции? Мы уже указывали, что если ДНК выполняет роль генетического материала, то различные линейные сегменты ее могут представлять собой различные гены. Если это так, то различия между генами должны касаться последовательности образующих их органических оснований. Если рассматривать только четыре обычных дезоксириботида, то сколько может быть различных динуклеотидных последовательностей? Первым нуклеотидом может быть один из четырех, вторым — также один из четырех и т. д. Иными словами, существует $4 \times 4 = 16$ различных возможных линейных порядков в динуклеотидах. Порядок расположения динуклеотидов можно определить экспериментально следующим образом. Один из четырех трифосфатов, добавляемых к субстрату, содержит внутренний фосфат, меченный P^{32} , в то время как другие три таковых не содержат. Во время экстенсивного синтеза ДНК F^* присоединяется в положение 3' сахара расположенного рядом нуклеотида (см. левую часть рис. 21—2 и рис. V—8 в Приложение V). Этот соседний нуклеотид можно идентифицировать, если синтезированный продукт подвергнуть воздействию ДНКазы микрококков и селезеночной фосфодиэстеразы. Как уже говорилось, последний фермент вызывает образование дезоксирибозид-3'-монофосфатов, расщепления цепь в положениях 5'. В результате такого расщепления меченый фосфат (F^*) будет найден связанным в положении 3' с дезоксирибозидом, лежащим впереди того дезоксириботида, с которым он включился в нить ДНК. В ферментативном переваре затем определяют частоту встречаемости F^* в $dA\ 3'-F^*$, $T\ 3'-F^*$, $dC\ 3'-F^*$ и $dG\ 3'-F^*$. В случаях, когда F^* исходно содержался в dAF^*FF , можно сделать вывод об относительной линейной частоте встречаемости TA , AA , CA и GA . Если вся процедура повторяется 4 раза с использованием в каждом случае различных меченых трифосфатов, то можно определить относительную частоту встречаемости всех 16 последовательностей.

Такому определению ближайшего соседнего нуклеотида (nearest-neighbor analysis) были подвергнуты ДНК, синтезированные с использованием ряда различных ДНК. Как уже упоминалось, ДНК, выделенная из частиц бактериофага $\phi\ X\ 174$, однонитчатая; химический анализ обнаружил следующий состав оснований в ней: $A = 0,246$, $T = 0,328$, $C = 0,185$ и $G = 0,242$. Если синтез ведет к образованию комплементарных пар оснований, то экстенсивная реакция с использованием ДНК фага $\phi\ X\ 174$ и всех четырех меченых трифосфатов, прекращенная после того, как будет синтезировано около 20% ДНК, должна привести к образованию комплементарной меченой ДНК, содержащей 0,328 A , 0,246 T , 0,242 C и 0,185 G . Полученные значения точно соответствуют ожидаемым. Если в качестве матриц использовать старые и новые нити ДНК, то после 600% синтеза найденное соответствует ожидаемому: $A = T$ и $C = G$. Кроме того, ожидается, что A и T имеют частоту, равную $1/2$ ($0,328 + 0,246$), т. е. 0,287, а C и $G = 0,224$. Опять эксперименты подтверждают ожидаемое.

Можно осуществить 20%-ный синтез в четырех повторностях, каждый раз используя иной меченый трифосфат. Таким способом удастся определить соседние нуклеотиды и частоту возникновения каждой из 16 возможных комбинаций динуклеотидов. Таким образом была найдена частота встречаемости всех последовательностей (например, 0,054 для GA ; 0,064 для TC ; 0,052 для CT и 0,069 для AG). Анализ, позволяющий определить ближайший нуклеотид, может быть также проведен после 600% синтеза. Если комплементарная нить синтезируется в том же направлении, что и нить матрицы, то на основании результатов, полученных в опыте

с 20%-ным синтезом, следует ожидать, что $ГА = ЦТ = \frac{1}{2}(0,054 + 0,052) = 0,053$ и $ТЦ = АГ = 0,067$. С другой стороны, если две комплементарные нити синтезируются в противоположных направлениях, то следует ожидать, что $ГА = ТЦ = \frac{1}{2}(0,054 + 0,064) = 0,059$, а $ЦТ = АГ = 0,061$. Наблюдаемые в опытах значения (0,058 ГА; 0,065 ГЦ; 0,064 ЦТ и 0,058 АГ) явно более соответствуют ожидаемым для комплементарных нитей, синтезированных *in vitro* в противоположных направлениях, так же как и значения, полученные для других динуклеотидных последовательностей.

Химический анализ ДНК *Mycobacterium phlei* обнаружил следующий состав оснований: 0,162 А; 0,165 Т; 0,335 Ц и 0,338 Г. Экстенсивный синтез позволяет установить относительное количество основания Х, включенного в ДНК, исходя из суммы отдельных частот, с которыми встречаются ХА, ХТ, ХС и ХГ пары. Когда в качестве Х поочередно выступали А, Т, Ц и Г, то относительная частота встречаемости была равна 0,162, 0,164, 0,337, 0,337 соответственно. Таким образом, анализ, позволяющий определить частоту ближайших соседних нуклеотидов, свидетельствует о том же, что уже было показано независимо химическими анализами, а именно, что продукту экстенсивного синтеза свойственна та же последовательность оснований, что и природной двунитчатой ДНК, используемой в качестве затравки — матрицы.

Вопрос о том, случайна ли последовательность оснований вдоль цепи тимуса телянка в качестве затравки-матрицы и определяя частоту встречаемости всех динуклеотидов в продукте. Так, было установлено, что частота встречаемости ЦГ равна 0,016, а ГЦ — 0,044. Если бы эти два динуклеотида встречались с равной частотой, то гипотеза о случайной последовательности нуклеотидов в нити была бы подтверждена. Однако обнаруженные частоты явно различны, поэтому последовательность оснований в нити ДНК нельзя считать случайной. Неслучайность последовательности оснований подтверждается также и другими данными. Так, оказалось, что 70% оснований распределены таким образом, что три или более пиримидинов (а следовательно, и пуринов) встречаются в следующих друг за другом линейно нуклеотидах; существует линейная последовательность из пяти следующих друг за другом Т; известны случаи, когда 4,9% ДНК содержит последовательность из восьми или более пиримидинов подряд.

Одинакова ли частота встречаемости ближайших нуклеотидов при использовании в качестве затравок-матриц нативной ДНК и ДНК, синтезированной из этой нативной ДНК? Частота встречаемости динуклеотидов при использовании в качестве затравки-матрицы синтезированной ДНК тимуса телянка по существу не отличается (например, ЦГ—0,001, тогда как ГЦ = 0,042) от той, которая наблюдается при использовании в качестве затравки-матрицы нативной ДНК тимуса телянка (см. выше). Следовательно, как показывает определение частоты встречаемости соседних нуклеотидов, продукты синтеза в случае использования в качестве затравки-матрицы нативной ДНК и ДНК, синтезированной из нативной ДНК, идентичны.

Для ДНК тимуса телянка соотношение $\frac{А+Т}{Ц+Г}$ равно 1,25, а для ДНК *B. subtilis* — 1,29. Хотя эти соотношения очень близки, маловероятно, что один из этих организмов является молекулярным полиплоидом другого (см. стр. 280). В самом деле, динуклеотидные последовательности, определенные для ДНК, синтезированной на бактериальной ДНК (например, ЦГ = 0,050 и ГЦ = 0,061), весьма отличаются от таковых для ДНК тимуса телянка (0,016 и 0,044 соответственно). У высших растений и животных ЦГ встречается со значительно меньшей частотой, чем ожи-

дается при случайной последовательности нуклеотидов, тогда как у бактерий наблюдается обратная картина. Следует также указать, что в различных нормальных и опухолевых тканях одного и того же организма частоты встречаемости нуклеотидов практически одинаковы. Отсюда следует, что *каждый тип природной ДНК обладает уникальной и воспроизводимой последовательностью динуклеотидов, которую нельзя предсказать, исходя из нуклеотидного состава.*

СИНТЕЗ ДНК DE NOVO

Двунигчатый полимер из А и Т, образующийся de novo (о нем говорилось ранее), может быть использован в качестве затравки-матрицы для изучения последовательности динуклеотидов в нем. Найдено, что встречаются только АТ и ТА последовательности; таким образом, очевидно, что А и Т строго чередуются в нити, образуя так называемый *кополимер из АТ* или *dAT (d-AT)*. Синтез de novo из dAT довольно длинной нити, которая могла бы служить в качестве матрицы для экстенсивного синтеза, требует лаг-периода в течение нескольких часов, во время которого dАФФФ, ТФФФ, Mg^{++} и ДНК-полимераза *E. coli* инкубируются вместе. Предполагалось, что во время лаг-периода ДНК-полимераза *E. coli* катализирует образование отдельных нитей de novo из отдельных дезоксирибозид-5'-трифосфатов. После того, как синтез нити начался, короткая нить, или *олигодезоксириботид*, может служить затравкой для удлинения своей же нити. В присутствии одного dАФФФ или ТФФФ dAT добавляет одну или две единицы dАФ или ТФ на цепь в ограниченной реакции. Ни dЦФ, ни dГФ не присоединяются к dAT полимеру при добавлении к субстрату dЦФФФ и (или) dГФФФ, независимо от того, присутствуют или отсутствуют dАФФФ и ТФФФ. Отсюда ясно, что как для ограниченного, так и для экстенсивного синтеза dAT необходимо образование пар оснований. Возможно, что при ограниченной реакции образуется отдельная нить из dAT, которая складывается таким образом, что пары оснований оказываются друг против друга, кроме тех, которые находятся на нуклеотидном конце. Таким образом, лишь после того, как нить dAT достаточно удлинена, полимераза может использовать ее в качестве матрицы для связывания пар оснований. Следует указать, что в ограниченной или экстенсивной реакциях синтеза пар оснований лаг-период отсутствует.

Без предсуществующей ДНК и после лаг-периода полимераза *E. coli* способна катализировать — в присутствии Mg^{++} и высоких концентраций dЦФФФ и dГФФФ — образование другого двунигчатого полимера, содержащего только Ц и Г. Анализ ближайшего соседствования обнаруживает только две последовательности динуклеотидов, ЦЦ и ГГ. Очевидно, полимер, названный *dГdЦ* (или *dГЦ*), состоит из двух гомополимеров; одна нить содержит только Ц, другая — только Г. Две нити спариваются основаниями, образуя двойную спираль. После экстенсивного синтеза dAT, $A = T$, большая же часть образующегося продукта dГdЦ содержит 56—81% dГФ.

Существование обоих полимеров — dAT и dГdЦ — свидетельствует о том, что последовательность оснований в определенных нитях не случайна. Такие нити могут иметь биологическое значение. Об этом ярко свидетельствует существование «природного dAT» полимера, обнаруженного Суэока в сперме одного из видов краба. Анализ ближайшего соседствования показывает, что этот полимер, составляющий примерно 30% от общего содержания ДНК, содержит А и Т в строго чередующейся последовательности в 93% случаев динуклеотидной последовательности. Около 3% оснований, соединенных с таким природным полимером dAT,

представлены Г или Ц, причем найдены все 16 динуклеотидных последовательностей. Можно подозревать, что Г- и Ц-содержащие нуклеотиды представляют собой загрязнение типичной ДНК, составляющей 70% от общего количества ДНК. Если это так, то экстенсивный синтез *in vitro*, использующий в качестве затравки-матрицы природный полимер dAT, должен протекать одинаково быстро, независимо от того, добавлены или нет к субстрату, содержащему dAФФФ и ТФФФ, dЦФФФ и dГФФФ. Однако показано, что скорость репликации без последних двух трифосфатов составляет лишь 19% от скорости, наблюдаемой в их присутствии. Следовательно, подтверждается точка зрения, согласно которой Г и Ц представляют собой составную часть «природного» dAT полимера.

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ТИМУСА ТЕЛЕНКА

Все процессы синтеза ДНК, обсуждавшиеся до сих пор, независимо от того, идут ли они *de novo* (путем синтеза отдельных нитей без затравки) или с комплементарным спариванием оснований (как в случае ограниченного и экстенсивного синтезов), требуют присутствия ДНК-полимеразы *E. coli*. ДНК-полимераза, выделенная из тимуса телят, неспособна образовывать dAT или dГdЦ *de novo*; иными словами, она неспособна осуществлять синтез в отсутствие затравки (F. J. Bollum, 1963, 1964). Матричный синтез с образованием Н-связей, приводящих к спариванию оснований, начинается, когда длина цепи превышает 20 мономеров. ДНК-полимераза из тимуса телят, подобно ДНК-полимеразе из *E. coli*, использует ДНК в качестве матрицы для синтеза ДНК, напоминающей нативную ДНК по первичной и вторичной структуре, составу, последовательности и размеру молекулы; при тепловой денатурации нити синтезированной ДНК не разделяются полностью.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕПЛИКАЦИЯ *IN VITRO*

До сих пор рассматривались данные, согласно которым все или почти все физические и химические свойства продукта, получаемого в процессе экстенсивного синтеза ДНК, свидетельствуют в пользу того, что это — процесс биологический. Однако существуют некоторые различия между процессами синтеза *in vitro* и *in vivo*. Очевидно, ДНК-полимераза *F. coli* работает *in vitro* медленнее, чем *in vivo*; в то же время ДНК-полимераза тимуса телят дает максимальный выход, достигающий 100%. Оба фермента участвуют в образовании ДНК, нити которой не разделяются полностью при тепловой денатурации; эта особенность может быть связана с образованием разветвленной ДНК, появляющейся *in vitro* при участии фермента *E. coli*. Все различия такого рода могут быть обусловлены загрязнениями, имеющими место при синтезе *in vitro* и не встречающимися *in vivo*, а также изменениями, которые происходят при выделении ДНК, синтезированной *in vivo*, и ее использовании для синтеза *in vitro*. Если учесть все эти возможности, то остается мало сомнений в том, что экстенсивный синтез *in vitro* осуществляется в основном одним и тем же способом, что и в живой клетке, и что при этом по существу образуется тот же продукт.

Наконец, особое внимание следует уделить ДНК-полимеразам, необходимым для осуществления экстенсивного синтеза ДНК. Все описанные ранее ферменты отличаются специфичностью, так как они действуют на один или несколько определенных субстратов, обычно модифицируемых одним и тем же способом. Например, трипсин разрывает пептидные связи только в тех местах полипептидной цепи, где присутствуют лизин или аргинин. ДНК-полимеразы — это совершенно своеобразные фер-

менты
щая к
ДНК-
включ
примен
способ
синтез
и дезо
на то,
или го

СИНТЕЗ

Исполь
ренных
верить
зовать
F. Sava
АФФФ
и тимид
без заме
анализо
затравк
поли-У
ни одно
ствовать
вании п
присутс
того, ка
(A + У)
Следоват
димому,
поли-(A-
синтезир
ральные
зой для с
возможне
Подоб
для пони
использу
синтеза Д
происходи
ления нп

ЗАКЛЮЧЕ

ДНК мож
получить,
фосфаты д
дина, пон
меразы на
щей как м
удлиненны
спаривани
зуемой в р
предсущест

менты, работа которых определяется длинной матрицей; нить, действующая как матрица, диктует, какой из мономеров может быть присоединен ДНК-полимеразой к этой нити. *In vitro* рибонуклеотиды могут быть включены в концевые положения в ДНК (J. S. Krakow и др. 1961); при применении ДНК в качестве затравки-матрицы ДНК-полимераза *E. coli* способна использовать смесь рибозид- и дезоксирибозид трифосфатов для синтеза комплементарных нитей, которые содержат как риботиды, так и дезоксириботиды (P. Berg и др. 1963). Однако ничто не указывает на то, что такие смешанные нити РНК — ДНК имеют биологическое или генетическое значение.

СИНТЕЗ ДНК ИЗ РНК

Используя поли- $(A + U)$, т. е. двойную спираль, составленную из спаренных гомополимеров адениловой и уридилевой кислот, можно проверить способность активируемой $MgCl_2$ ДНК-полимеразы *E. coli* использовать различные экстракты для синтезов *in vitro* (S. Lee-Huang a. L. F. Cavalieri, 1963; F. Cavalieri, 1963). При использовании в субстрате *d* АФФФ и ТФФФ спаренные основаниями гомополимеры дезоксиадениловой и тимидиловой кислот [обозначенные как поли- $(dA + T)$] синтезируются без заметного лаг-периода. Каждая нить ДНК гомополимерна (это доказано анализом ближайшего соседствования); следовательно, поли- $(A + U)$ служит затравкой-матрицей. Образования комплекса из поли-А с поли-Т или поли-У с поли-*d*А не наблюдали. Более того, ни однонитчатый поли-А, ни однонитчатый поли-У, ни трехнитчатый полириботид не могут действовать в качестве затравки-матрицы для синтеза ДНК; при использовании поли- $(A + U)$ в качестве затравки-матрицы синтез не идет, если присутствует либо один *d* АФФФ, либо ТФФФ. Наконец, даже после того, как прошел однократный синтез, большинство исходных поли- $(A + U)$ [или почти все поли- $(A + U)$] присутствуют в исходной форме. Следовательно, двуспиральных гибридных молекул ДНК — РНК, по-видимому, не образуется; не наблюдается также полного разделения нитей поли- $(A + U)$ при синтезе поли- $(dA + T)$; вероятно, обе нити ДНК должны синтезироваться одновременно. Можно также использовать другие спиральные двунитчатые гомополимерные полириботиды с ДНК-полимеразой для синтеза других двунитчатых гомополимерных ДНК (одна из возможностей — *d* Г *d* Ц).

Подобные исследования синтезов *in vitro* могут иметь важное значение для понимания роли РНК *in vivo* и, в частности, для решения вопросов, используется ли *in vivo* РНК (генетическая или не генетическая) для синтеза ДНК (генетической или не генетической)? В каких пределах происходит репликация нуклеиновых кислот *in vivo* без полного разделения нитей и образование на матрице гибридных молекул?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ДНК может быть синтезирована *in vitro*. Экстенсивный синтез можно получить, используя предсуществовавшую однонитчатую ДНК, 5'-трифосфаты дезоксиаденозина, дезоксицитидина, дезоксигуанозина и тимидина, ионы магния и ДНК-полимеразу. В процессе синтеза работа полимеразы направляется предсуществующей однонитчатой ДНК, действующей как матрица. *In vitro* нити удлиняются на нуклеозидном конце; щей как матрица. *In vitro* нити удлиняются на нуклеозидном конце; удлиненные нити служат в качестве затравки. При синтезе, требующем спаривания оснований, лаг-периода не наблюдается; количество образующейся в результате этих синтезов новой ДНК либо ограниченное (если предсуществующая нить слабо удлинена), либо весьма большое (если

полностью образованы новые нити). После лаг-периода ДНК-полимераза *E. coli* способна синтезировать полимеры *dAT* и *dГ dЦ de novo*, т. е. без предсуществующей ДНК; ДНК-полимераза тимуса теленка не способна катализировать синтеза ДНК *de novo*.

Анализ ближайшего соседствования показывает, что комплементарные нити синтезируются *in vitro* в противоположных направлениях, и каждый тип природной ДНК имеет уникальную динуклеотидную последовательность, не предопределяемую нуклеотидным составом. Таким образом, последовательность нуклеотидов *in vivo* не случайна, что находит себе блестящее подтверждение в обнаружении ДНК типа «природного полимера *dAT*» у краба.

ДНК, образуемая в процессе экстенсивного синтеза *in vitro*, весьма напоминает природную ДНК в отношении первичной и вторичной структуры, а также в отношении других физических и химических свойств. Поэтому синтез ДНК *in vitro* считают биологическим процессом. При этом подтверждается гипотеза Уотсона — Крика о структуре хромосомной ДНК и ее репликации после разделения нитей посредством образования комплементарных нитей. Сообщалось, что *in vitro* ДНК-полимераза *E. coli* использует двунитчатую РНК для синтеза комплементарной двунитчатой ДНК без полного разделения нитей.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

- 21.1. Имеет ли эта глава отношение к генетике? Объясните.
- 21.2. Какой из экспериментов, описанных в этой главе, Вы считаете наиболее важным?
- 21.3. Чем отличается действие фосфодиэстеразы селезенки от действия диэстеразы змеиного яда?
- 21.4. Какие условия необходимо соблюдать для осуществления *in vitro* синтеза ДНК, идущего ограниченно? А для экстенсивного синтеза?
- 21.5. Как влияет наличие или отсутствие предсуществующей ДНК на образование нити ДНК *in vitro*?
- 21.6. Перечислите факты, позволяющие считать, что синтез ДНК *in vitro* представляет собой биологический процесс.
- 21.7. Действительно ли работа ДНК-полимеразы *E. coli* определяется только ДНК *E. coli*? Объясните.
- 21.8. Происходит ли разделение нитей во время экстенсивного синтеза ДНК *in vitro*? Объясните.
- 21.9. Каково значение анализа ближайшего соседствования нуклеотидов?
- 21.10. Что неправильно в рис. 8 Приложения V?
- 21.11. Что произойдет с соотношением $\frac{A+T}{C+G}$, если предотвратить истощение субстрата и позволить экстенсивному синтезу идти в течение нескольких часов?
- 21.12. Как объяснить тот факт, что при экстенсивном синтезе, использующем *dГdЦ* в качестве затравки-матрицы, обычно образуется продукт, который содержит Г больше, чем Ц?
- 21.13. В чем сходство и различие между ДНК полимеразами, выделенными из *E. coli* и из тимуса теленка?
- 21.14. Что имеют в виду, когда утверждают, что вновь синтезированная ДНК ковалентно связана с затравкой, но не связана ковалентно с матрицей?
- 21.15. Опишите три разных метода, которые можно использовать для синтеза *dГdЦ in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

- P. Berg, H. Fancher, M. Chamberlin. The Synthesis of Mixed Polynucleotides Containing Ribo- and Deoxyribonucleotides by Purified Preparations of DNA Polymerase from *Escherichia coli*. In: «Informational Macromolecules», H. J. Vogel, V. Bryson and J. O. Lampen (Eds). N. Y., 1963, p. 467.
- M. J. Bessman. The Replication of DNA in Cell-Free Systems. Chap. I, p. 1. In: «Molecular Genetics», pt 1, J. H. Taylor (Ed.), N. Y., 1963.
- F. J. Bellum. Primer in DNA Polymerase Reactions.— *Progress in Nucleic Acid Res.* 1963, 1, 1.
- F. J. Bellum. Studies on the Nature of Calf Thymus DNA-Polymerase Products.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1964, 28, 21.
- K. Burton K., M. R. Lunt, G. B. Petersen, J. C. Siebke. Studies of Nucleotide Sequences in Deoxyribonucleic Acid.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1964, 26, 27.
- L. F. Cavalieri. Nucleic Acids and Information Transfer.— *J. Cellular and Compar. Physiol.*, 1963, 62 (Suppl. 1 to N 2), 111.
- U. Habermann, S. Habermannova, M. Cerhova. The Distribution of Nucleotides into Pyrimidine and Purine Nucleotide Clusters in the Polynucleotide Chain of DNA from *Escherichia coli* C.— *Biochim. et biophys. acta*, 1963, 76, 310.
- A. Kornberg. Enzymatic Synthesis of DNA. N. Y., 1962.
- A. Kornberg, L. L. Bertsch, J. F. Jackson, Khorana H. G. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid., XVI. Oligonucleotides as Templates and the Mechanism of Their Replication.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, 315.
- J. S. Krakow, H. O. Kammen, E. S. Canellakis. The Incorporation of Ribonucleotides into Terminal Positions of Deoxyribonucleic Acid.— *Biochim. et biophys. acta*, 1961, 53, 52.
- S. Lee-Huang, L. F. Cavalieri. Polyribonucleotides as Templates for Polydeoxyribonucleotides.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 1963, 50, 1116.
- R. L. Sinsheimer. Single-Stranded DNA.— *Scient. Amer.*, 1962, 207, 109.
- J. H. Spencer, E. Chargaff. Studies on the Nucleotide Arrangement in Deoxyribonucleic Acids. VI. Pyrimidine Nucleotide Clusters: Frequency and Distribution in Several Species of the AT-Type.— *Biochim. et biophys. acta*, 1963, 68, 18.
- C. C. Richardson, C. L. Schildkraut, A. Kornberg. Studies on the Replication of DNA by DNA Polymerases.— *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, 1964, 28, 9.

Глава 22

КЛОНЫ. ТРАНСФОРМАЦИЯ. РЕКОМБИНАЦИЯ НИТЕЙ IN VITRO

Возникновению существующих ныне представлений о механизмах биологической репликации ДНК in vivo в значительной мере способствовали эксперименты, в которых использовали ДНК и ДНК-полимеразу бактерий. Электронномикроскопические исследования бактерий позволили обнаружить ядерную зону, внутри которой определяется близкая хромосомам структура, состоящая из ДНК и не содержащая основного белка (стр. 287). ДНК из таких ядерных тел напоминает типичную хромосомную ДНК: для нее справедливы равенства $A = T$ и $C = G$, для нее характерны сходные первичная и вторичная структуры, механизм синтеза и молекулярная целостность. Поэтому представляется вполне оправданным взгляд на бактериальную ДНК как на хромосомную ДНК и, несмотря на химическую простоту этой структуры, возможность использовать термин «хромосома» при обсуждении бактерий.

Если бактерии содержат хромосомную ДНК, то можно полагать, что они содержат также гены хромосомного типа, согласно гипотезе (уже



РИС. 22-1.

Электронномикроскопические фотографии *Escherichia coli*

А — целые клетки, в которых ядерные зоны различимы в виде менее плотных зон. Исходное ув. 3 000, на рисунке — около 12 000 (по E. Kellenberger); Б — тонкий срез, показывающий ядерные зоны и тонкие нити, содержащие ДНК. Внутри них. Исходное ув. — 10 000, на рис. — примерно 15 000 (по W. Schreil)

получившей много косвенных подтверждений) о том, что именно ДНК служит генетическим материалом. Удобны ли бактерии в качестве экспериментального материала для генетических исследований? Электронно-микроскопические исследования показывают, что каждая клетка *Escherichia coli* содержит от одной до четырех ядерных зон — обычно две или четыре (рис. 22—1) — без ядерных мембран. Морфология деления ядра еще не изучена. Однако дупликация ДНК наблюдается при каждом делении ядерного тела; отсюда можно заключить, что дочерние ядерные тела генетически идентичны, точно так же, как они идентичны после типичного митоза.

КЛОНЫ

После репликации ядерной зоны бактерия делится, образуя дочерние бактериальные клетки. Такой способ увеличения числа бактериальных клеток представляет собой бесполой процесс, названный *вегетативным размножением*. Начатое с одной бактерии непрерывное вегетативное размножение ведет к образованию популяции клеток, названной *клоном*; если исключить мутации, то все члены клона являются генетически идентичными.

Если мутация произошла во время роста клона, то она передается всему потомству мутантной клетки. В результате образуется генетически мозаичный клон, в котором доля мутантных особей будет варьировать в зависимости от времени возникновения мутации и относительной репродуктивной способности мутантных и немутантных клеток. (Все клетки организма, размножающегося половым путем, относятся по происхождению к клоновым, за исключением клеток, участвующих в оплодотворении и мейозе, и их «потомства», так что многоклеточные организмы могут быть также мозаичными в отношении той или иной мутации.)

Рассмотрим те свойства бактерий и их клонов, которые могут иметь значение при изучении мутаций. Огромным преимуществом использования бактерий при исследовании мутагенеза оказывается та легкость и скорость, с которой могут быть получены большие популяции бактериальных клеток. Так, при соответствующих условиях культивирования *E. coli* делится примерно каждые полчаса. При таких условиях после 30 последовательных генераций, занимающих примерно 15 часов, одна клетка образует клон, содержащий около 10 миллиардов (10^{10}) особей. Число клеток *E. coli*, образуемых из одной клетки после n генераций (или t часов), можно рассчитать, определяя значение 2^n (или 2^{2t}) (рис. 22—2). Объем рабочих помещений в опытах с бактериями не составляет проблемы, так как все 10^{10} особей могут быть легко выращены в жидком бульоне в обычной пробирке.

Преимущество, обусловленное малым размером бактериальной клетки, становится, однако, помехой при определении фенотипических изменений, обусловленных мутацией. Мутантные клетки с измененной морфологией могут быть обнаружены при микроскопическом просмотре культур. К сожалению, для отдельных бактериальных

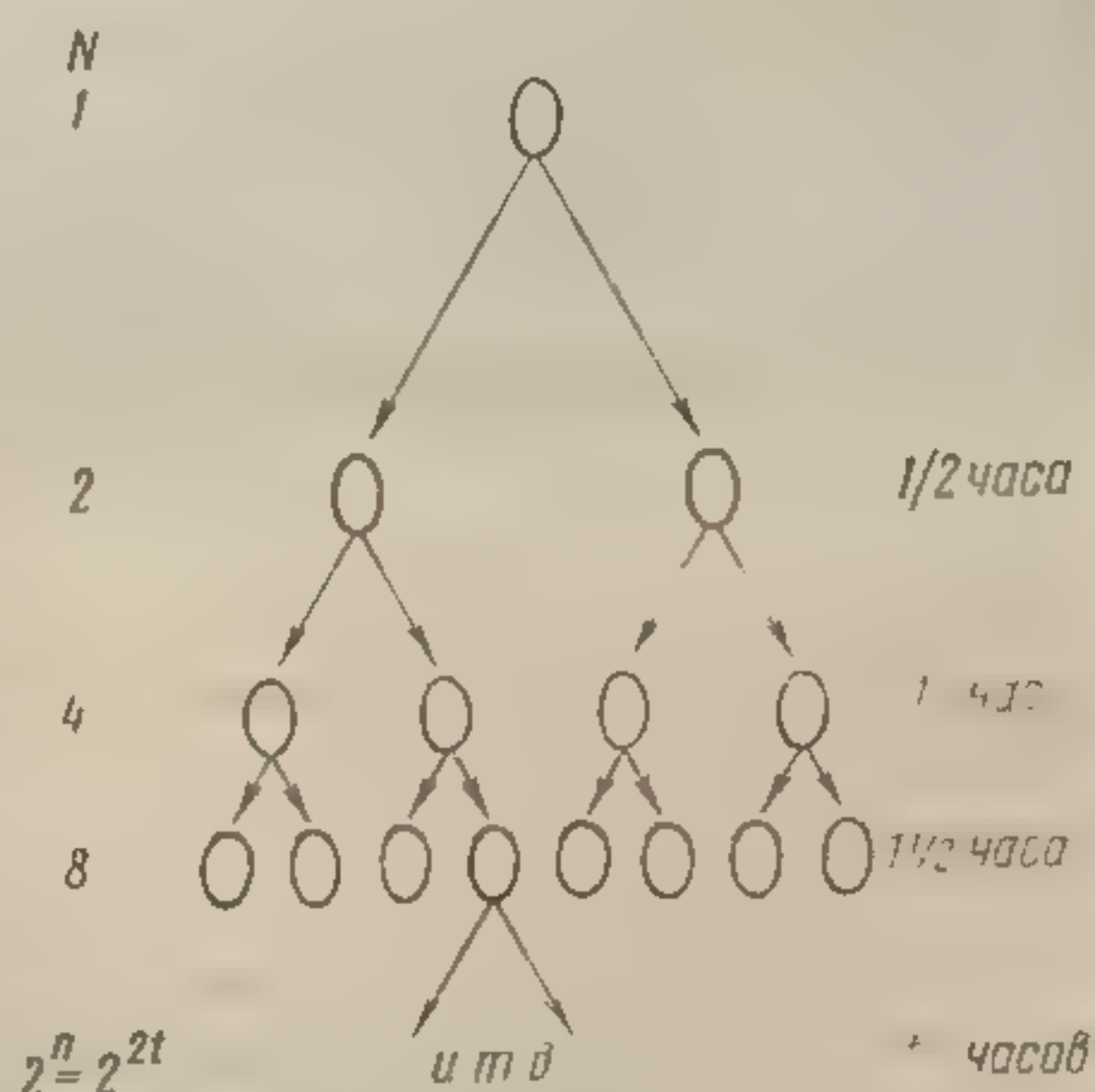


РИС. 22-2.

Обусловленное вегетативным размножением увеличение числа бактерий в геометрической прогрессии

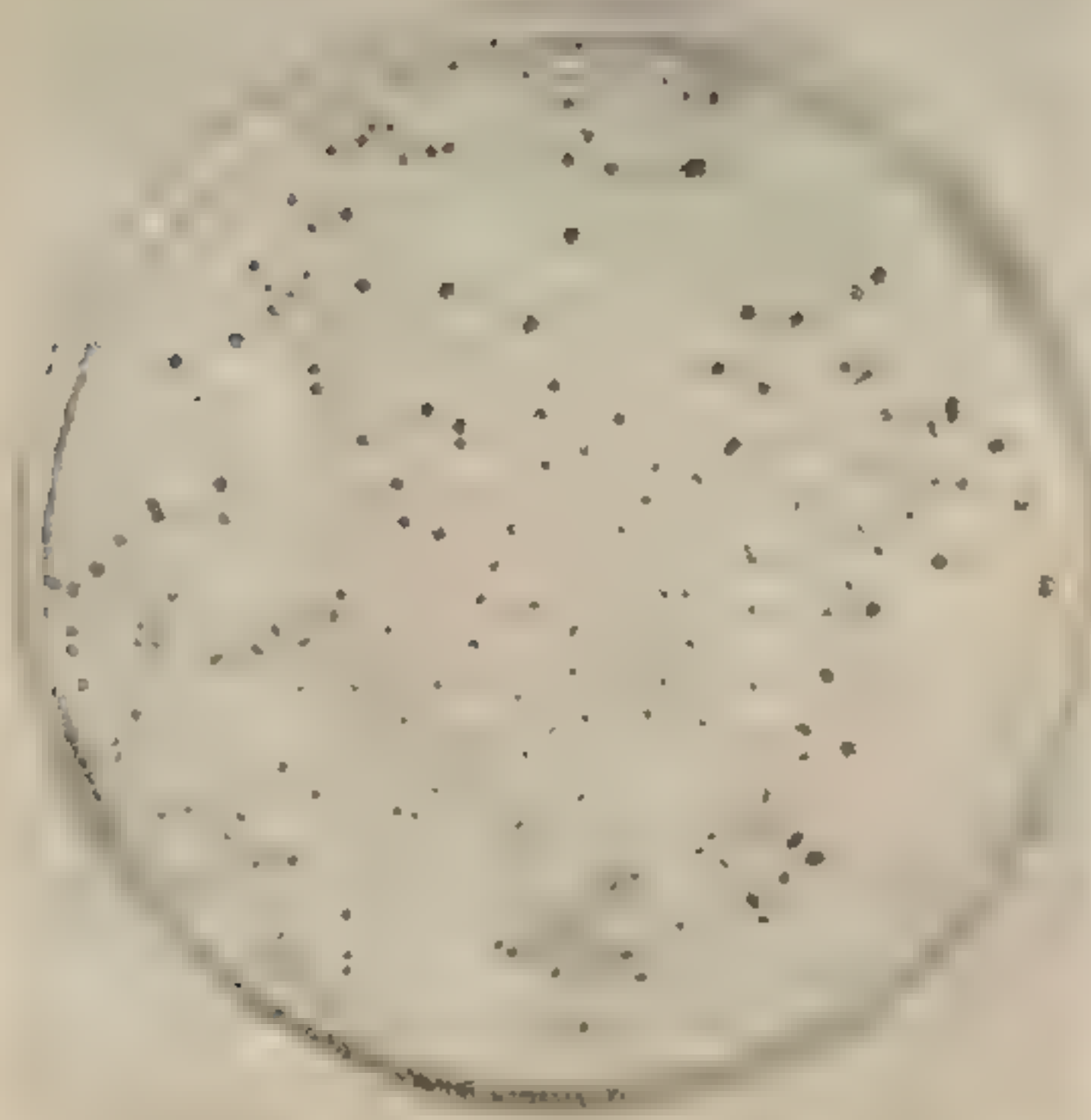


РИС. 22-3.

Отдельные выросшие на питательной среде в чашках Петри клоны, полученные в результате посева разведенной культуры бактерий



РИС. 22-4.

Отдельные клоны бактерий полученные с помощью посева штрихом (по N. Melchen)

сти свежей питательной среды с агаром (рис. 22—4). В некоторых местах на среде останутся отдельные бактериальные клетки, которые дадут начало изолированным колониям. Выбор того или иного метода зависит от требуемой точности выявления клонов.

Изучение отдельной бактериальной клетки ограничено морфологической изменчивостью, поскольку проведение физиологических и биохимических исследований на таком микроскопическом уровне еще не пред-

клеток морфологическая изменчивость таких признаков, как размер, форма, наличие капсулы, пигмента, или жгутиков, выражена слабо. Обнаружить удастся только мутанты с заметным повреждением этих довольно немногочисленных морфологических признаков; причем их обнаружение в значительной степени ограничено необходимостью индивидуального просмотра бактерий.

Если с помощью микроскопа удастся обнаружить клетку, похожую на мутантную, то необходимо ее выделить и определить, изучив образуемый ею клон, способна ли она к передаче нового признака потомству. Один из способов выделения отдельной бактериальной клетки — это утомительная, но надежная процедура выделения отдельной клетки из бактериальной культуры с помощью микроманипулятора с последующим помещением ее в свежую культуральную среду. Отдельные бактериальные клетки могут быть также получены с помощью двух менее точных, но быстрых не прямых методов. Если бактерии выращены в жидкой среде, то можно развести культуру так, что определенный объем ее будет содержать лишь несколько особей. Этот объем культуры выливается на поверхность чашки Петри, содержащей питательный агар, причем отдельные клетки распределяются по поверхности агара случайно. В результате клоны, образуемые каждой клеткой, располагаются отдельно друг от друга (рис. 22—3). Другой способ заключается в том, что небольшое количество бульонной культуры берут стерильной петлей, обычно используемой для посевов, и штриховыми движениями петли распределяют бактерии по поверхно-

ставляется возможным. Можно, однако, использовать тот факт, что (если исключить мутации) клоны состоят из генетически идентичных особей. Генетически различные клоны могут фенотипически различаться в отношении размера, очертания и цвета колоний, образуемых ими на агаре. Генетически различные клоны способны также по-разному реагировать на присутствие разных красителей, ядов и вирусов. Поэтому по фенотипическому проявлению клона можно определить генотип отдельной бактериальной клетки.

E. coli представляет собой легко культивируемый организм, так как она способна расти и размножаться на простой синтетической среде. Штаммы, растущие на такой основной минимальной среде, относят к *прототрофным*, или к дикому типу, поскольку они способны синтезировать многочисленные метаболические компоненты клетки, отсутствующие в среде. В этом отношении прототрофы *E. coli* или других бактерий напоминают дикий тип *Neurospora*, которая также растет на минимальной синтетической среде. Поэтому не удивительно, что у бактерий (так же, как и у *Neurospora*) наибольшее число мутантов получено при изучении биохимической изменчивости различных клонов, в особенности изменчивости, связанной с изменением пищевых потребностей. Многочисленные мутанты, возникающие либо спонтанно, либо после воздействия физических или химических мутагенов, требуют для своего роста и размножения добавления не менее чем одного химического вещества к основной среде. Так, для роста одного штамма *E. coli* требуется добавление к минимальной среде аминокислоты треонина, в то время как для другого штамма требуется добавление аминокислоты метионина. Такие штаммы, рост которых зависит от тех или иных добавок к основной питательной среде, называются *ауксотрофными*.

ТРАНСФОРМАЦИЯ

Среди пневмококков (*Diplococcus pneumoniae*) встречается ряд генетических типов, которые могут быть охарактеризованы по их клональному фенотипу. Один тип, *S*, образует колонии с гладкой (smooth) поверхностью. Этот признак непосредственно связан с образованием полисахаридной капсулы. Поверхность колоний другого типа, *R*, шероховата (rough), так как образующие их бактерии лишены полисахаридной капсулы. Кроме того, отдельные типы *S* колоний можно отличить друг от друга по их антигенным свойствам; можно получить различные антисыворотки, которые вызывают специфическое связывание каждого отдельного типа *S*. Клетки типа *R* разделяются также на несколько различных антигенных типов; здесь также можно получить антисыворотки, которые специфически связывают их.

В одном из типичных экспериментов Гриффит и соавторы, а также Эвери и соавторы (1944) помещали большое число *R* клеток в питательный бульон, содержащий соответствующую анти-*R*-сыворотку. При продолжении роста на дно пробирки осаждаются комочки из агглютинированных клеток; в результате первоначально мутный бульон становится прозрачным. Если посеять такую надосадочную жидкость на питательный агар, то еще сохранившиеся в ней бактерии образуют типичные *R* колонии; мутация от *R* к *S* встречается настолько редко, что с помощью этой методики ее невозможно обнаружить.

Если осуществить тот же эксперимент, но в питательный бульон добавить также убитые нагреванием (65°C в течение 30 минут) *S* клетки, то при высева надосадочной жидкости на агар можно обнаружить многочисленные клоны *S* типа. Фенотип *S* устойчив и представляет собой результат какого-то генетического изменения. Следовательно, убитые нагреванием *S* клетки способны действовать подобно мутагену в гене-

тической трансформации R клеток в S клетки. Наиболее поразительно то, что тип образующегося S мутанта всегда оказывается идентичным типу убитых нагреванием бактерий, действующих, по-видимому, в качестве мутагена. Это явно уникальный случай, когда мутаген действует специфически, вызывая образование мутаций только в одном заранее известном направлении (определенный S тип, а не два или более S типов).

Для определения химической природы мутагена проверяют трансформирующую способность разных фракций S бактерий, убитых нагреванием. Фракции, содержащие только полисахаридную оболочку, белок или РНК, оказываются совершенно не активными; трансформирующей способностью обладает только фракция, содержащая ДНК. Хорошо очищенные экстракты ДНК полностью сохраняют способность к трансформации, даже если они содержат менее 0,02% белка или же обработаны агентами, денатурирующими белок, или протеолитическими ферментами. Химические и другие исследования (серологические тесты, электрофорез, ультрацентрифугирование и спектроскопия) показывают также, что активная ДНК не содержит поддающегося определению загрязнения в виде белка, свободных жиров или полисахаридов. Обработка РНКазой не влияет на трансформирующую активность очищенной фракции ДНК; при воздействии же ДНКазой трансформирующий фактор полностью разрушается. Последний результат свидетельствует о том, что трансформацию осуществляет высокополимерная ДНК.

Опыты с изучением дифракции рентгеновых лучей показывают, что трансформирующая ДНК имеет двунитчатую конфигурацию, соответствующую конфигурации хромосомной ДНК. Для трансформации может быть использована очищенная ДНК; следовательно, для осуществления этого процесса не требуется контакта между клеткой, действующей в качестве донора, и клеткой-реципиентом. Показано также, что в процессе трансформации не участвует какой-либо вирус. Поэтому можно с уверенностью сказать, что именно ДНК следует считать трансформирующим агентом.

Трансформация может происходить в любом направлении ($A \rightleftharpoons A'$); у бактерий может быть трансформирован любой хромосомный ген. Тип клеток A может быть трансформирован в тип A', который, в свою очередь, обеспечивает увеличение количества A' — ДНК, способной трансформировать другие A клетки в A'. Следовательно, ДНК, экстрагированная из трансформированных бактерий, представляет собой тот же трансформирующий фактор в увеличенных количествах.

Один трансформирующий фактор (A') способен трансформировать бактерии, имеющие любой из нескольких альтернативных фенотипов (например, A или A''). Если A' — ДНК, полученная из бактерий A-типа, трансформированных в A', используется для трансформации бактерий третьего генотипа, A'', то удастся обнаружить только A' трансформанты; следовательно, в такой трансформации участвуют только гены промежуточного донора. Этот результат показывает, что трансформация ведет к появлению переносимого изменения, связанного с потерей генетического материала реципиента и с одновременным приобретением нового генетического материала; таким образом, дело не сводится к простому добавлению определенного генетического материала к геному. Следовательно, генетическое изменение при трансформации происходит по типу замещения.

Судьбу трансформирующей ДНК можно проследить (L. Lerman а. L. Tolmach, 1957), пометив ее фосфатные группы радиоактивным P^{32} . В различные промежутки времени после обработки бактерий такой меченой ДНК берутся образцы бактерий, причем одна часть их анализируется на присутствие P^{32} в их ДНК, а другая часть используется для опре-

деления частоты трансформации. В экстрактах, содержащих хромосомную ДНК реципиента, меченую ДНК удастся обнаружить лишь после определенного периода обработки бактерий экстрактом такой ДНК. Частота трансформации клеток реципиента прямо пропорциональна количеству включенной таким образом меченой ДНК.

Приведенные результаты показывают, что трансформирующая ДНК действительно входит в бактерию и замещает некий сегмент хромосомной ДНК реципиента (пневмококки содержат около 6×10^6 пар дезоксирибонуклеотидов на ядерное тело), после чего вновь введенный материал реплицируется как нормальная часть хромосомы. Данные, подтверждающие факт замещения части ДНК реципиента трансформирующей ДНК, приводит Эфрусси-Тейлор (1951). Генетическая информация при трансформации переносится одной ДНК; поэтому генетическая трансформация служит прямым и окончательным доказательством того, что ДНК играет роль генетического материала. Следовательно, хромосомная ДНК содержит химические единицы генетического материала. Все последующие исследования трансформации подтверждают это заключение.

Теперь нам следует пересмотреть допущение, сделанное ранее в этой главе, согласно которому трансформация связана с мутацией. Первые данные по трансформации касались новых, редких изменений в генетическом материале и поэтому были названы мутациями (см. стр. 160). Теперь мы знаем, что при трансформации происходит замещение одного сегмента генетического материала другим. Новый тип генетического материала не возникает; наблюдается лишь перемещение уже существующих генов. Генетическая трансформация показана не только у *Pneumococcus*, но и у *Haemophilus*, *Xanthomonas*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Escherichia* и других организмов. В старых культурах *Neisseria* ДНК регулярно высвобождается (в слизистый слой) клетками, которые подвергаются самоперевариванию (автолизу). Такая ДНК эффективно осуществляет трансформацию, так же как и ДНК, полученная из чувствительных к пенициллину пневмококков, лизированных пенициллином. Используя различные генетически маркированные линии пневмококков, Оттоленги и Маклеод (1963) показали, что генетическая трансформация, обусловленная ДНК, освобождаемой из одного штамма и трансформирующей представителей другого штамма, проявляется спонтанно в организме зараженной мыши.

Две линии клеток человека (штамм D98⁺), культивируемые *in vitro*, генетически отличаются наличием или отсутствием фермента пироглутамат-аминотрансферазы (ИМФФаза). Частота спонтанных мутаций от ИМФФаза-зависимой к ИМФФаза-независимой линии менее одной клетки на 10^7 . Так как можно использовать культуральную среду, полностью предотвращающую рост зависимых клеток с образованием колоний (но не рост независимых клеток), то благодаря этому удастся обнаружить генетическую трансформацию даже в тех случаях, когда ее частота будет составлять 1 трансформированную клетку на 10^7 клеток. Обработка ИМФФаза-отрицательной линии с помощью ДНК, выделенной из ИМФФаза-положительных клеток, ведет к появлению ИМФФаза-положительных генетически трансформированных клеток с частотой, достигающей 4×10^{-1} трансформаций на реципиентную клетку (одна трансформация на 2500 обработанных клеток). Такая частота доказывает с очевидностью, что в экспериментальных условиях имеет место трансформация линий клеток человека (W. Szybalski, E. Szybalska a. G. Ragni, 1962, E. Szybalska a. W. Szybalski, 1962).

Так как генетическая трансформация — нередкое явление и при ее осуществлении не образуется новых генотипов, то ее и не следует считать своеобразной мутацией. Поэтому так же, как в случаях расщепления, независимого расщепления, кроссинговера и оплодотворения,

трансформацию следует рассматривать как один из механизмов генетической рекомбинации.

Исследования, проведенные на бактериях, показывают, что для осуществления процесса трансформации требуется ряд условий.

Компетентность клетки. В определенные периоды клеточного деления или роста бактериальной культуры трансформация не происходит; в другие периоды клетки компетентны для участия в этом процессе.

Связывание трансформирующей ДНК. Если клетки находятся в компетентном состоянии, то трансформирующая ДНК, вступающая сначала во временную связь с клетками, может быть удалена с помощью различных методов (включая обработку ДНКазой), если они применены до того, как ДНК вступит в устойчивую связь с клетками.

Проникновение трансформирующей ДНК. Полагают, что устойчиво связанная ДНК проникает в клетку реципиента. Вероятность трансформации находится в обратной зависимости от толщины полисахаридной оболочки, действующей, вероятно, как некий барьер, препятствующий связыванию и проникновению ДНК. После обработки ультразвуком трансформирующей ДНК вновь образуемые нити имеют молекулярный вес менее 4×10^5 . Такие нити не способны проникать в клетку. В клетки проникает только ДНК с высоким молекулярным весом.

Эти факты следует рассмотреть также в свете условий, при которых наблюдается проникновение ДНК в культуру тканей млекопитающих. В этом случае ДНК входит в клетку с помощью фагоцитоза, который происходит только тогда, когда ДНК прилипает к соответствующим большим не-ДНК частицам. *Пиноцитоз* — это другой процесс, который, подобно фагоцитозу, обеспечивает проникновение веществ в клетку. Чистые нуклеиновые кислоты не проникают в клетку с помощью пиноцитоза, однако к этому способны белки. Если же чистые нуклеиновые кислоты смешаны с белком, то пиноцитоз происходит и нуклеиновые кислоты включаются в клетку вместе с белком. Возможно, что проникновение ДНК высокого молекулярного веса в бактериальные клетки зависит от присутствия достаточного количества загрязняющего материала, способного стимулировать пиноцитоз или какой-либо другой механизм проникновения ДНК. Каким бы ни был способ проникновения трансформирующей ДНК, относительно короткие нити ДНК способны включиться в микробную клетку только в присутствии достаточных количеств белка.

Бактериальная поверхность содержит определенное число участков, которые служат рецепторами для ДНК. Поскольку нетрансформирующая ДНК (например, ДНК из отдаленных родов) может столь же легко проникать в клетку, эти рецепторные участки могут быть насыщены нетрансформирующей ДНК, в результате чего трансформирующая ДНК в клетку не проникает.

Синапсис. У разных видов бактерий могут быть найдены альтернативы одного и того же признака (например, устойчивость и чувствительность к стрептомицину или ауксотрофность и прототрофность в отношении определенного фактора роста). Основываясь на вполне разумном предположении о том, что один и тот же ген (и его альтернативы) осуществляет одинаковые, или сходные, функции у организмов различных видов, следует допустить возможность осуществления межвидовой трансформаций. Такого рода трансформация была осуществлена. Однако в любом конкретном случае межвидовая трансформация осуществляется с меньшей частотой, чем внутривидовая. Более того, снижение частоты трансформации реально и не обусловлено задержкой фенотипического проявления, которая наблюдается при межвидовой (но не внутривидовой) трансформации. Наличие межвидовой трансформации подтверждает предположение о том, что трансформируемый локус представляет собой нормаль-

ную часть генотипов обоих видов. Сравнительно небольшая частота межвидовых трансформаций не обусловлена, по-видимому, некомпетентностью клетки реципиента или неспособностью чужеродной ДНК связываться с клеткой-реципиентом или проникать в нее.

Трансформирующая способность уже проникшей в клетку ДНК может зависеть не только от гомологии трансформируемых локусов, но и от природы генов, сцепленных с теми генами, которые подвергаются трансформации. Эти соседние гены могут принимать участие в трансформации, влияя на синапсис трансформирующей ДНК с соответствующей областью генетического материала реципиента. При внутривидовой трансформации локусы, сцепленные с трансформируемыми, вероятно, гомологичны у реципиента и донора, так что между двумя сегментами наблюдается синапсис; при межвидовой трансформации эти локусы, по-видимому, не гомологичны и поэтому часто неспособны к синапсису или предотвращают возникновение последнего.

Интеграция. В тех случаях, когда предполагаемый синапсис между ДНК реципиента и трансформирующей ДНК действительно происходит, существует еще какой-то процесс, благодаря которому ген реципиента (ген, трансформация которого прослеживается) утрачивается хромосомой, и locus донора становится ее составной частью. Пониманию механизма этой конечной стадии трансформации способствует изучение частоты трансформации. Прежде всего следует отметить, что различные локусы трансформируются при внутривидовой трансформации с различной частотой. Используя гены, которые трансформируются с довольно высокой частотой, можно изучить частоту *двойных трансформаций*, т. е. частоту, с которой бактерии трансформируются в отношении двух маркеров, присутствующих в донорной ДНК. В отдельных случаях (например, при изучении устойчивости к пенициллину и стрептомицину) частота двойной трансформации бактерий приблизительно равна (в действительности несколько меньше) произведению частот отдельных трансформаций. Такие результаты, по-видимому, следует рассматривать как свидетельство того, что два локуса либо переносятся отдельными трансформирующими ДНК, либо находятся на значительном расстоянии в одной трансформирующей ДНК.

С другой стороны, маркеры в отношении стрептомициноустойчивости и сбраживания маннитола трансформируются вместе с частотой (0,1%), которая примерно в 17 раз превышает ожидаемую на основании произведения частот единичных трансформаций (0,006%). Следовательно, оба генетических маркера находятся в одной и той же трансформирующей частице, т. е. они, по-видимому, тесно сцеплены.

Если два локуса тесно сцеплены, то как объяснить случай единичных и двойных трансформаций в отношении этих локусов? Во время выделения ДНК может происходить ее фрагментация, поэтому определенная проникающая в клетку частица ДНК может в разных случаях иметь разный состав в отношении данных двух маркеров; иногда она может нести только один из них, тогда как в других случаях содержит оба эти маркера. Можно проверить эффект уменьшения размера частицы проникающей ДНК на частоту единичных и двойных трансформаций. При уменьшении размера частицы путем обработки ДНКазой или ультразвуком можно ожидать, согласно только что высказанной гипотезе, что разрыв фрагмента произойдет в ряде случаев как раз между двумя маркерами, в результате чего относительная частота двойных трансформаций уменьшится, а частота единичных трансформаций увеличится.

Оказалось, что при уменьшении размера фрагмента общая частота трансформации была ниже, что соответствует ожидаемому. Однако измерений в соотношении чисел двойных и единичных трансформаций не было найдено. Это свидетельствует об очень тесном сцеплении двух мар-

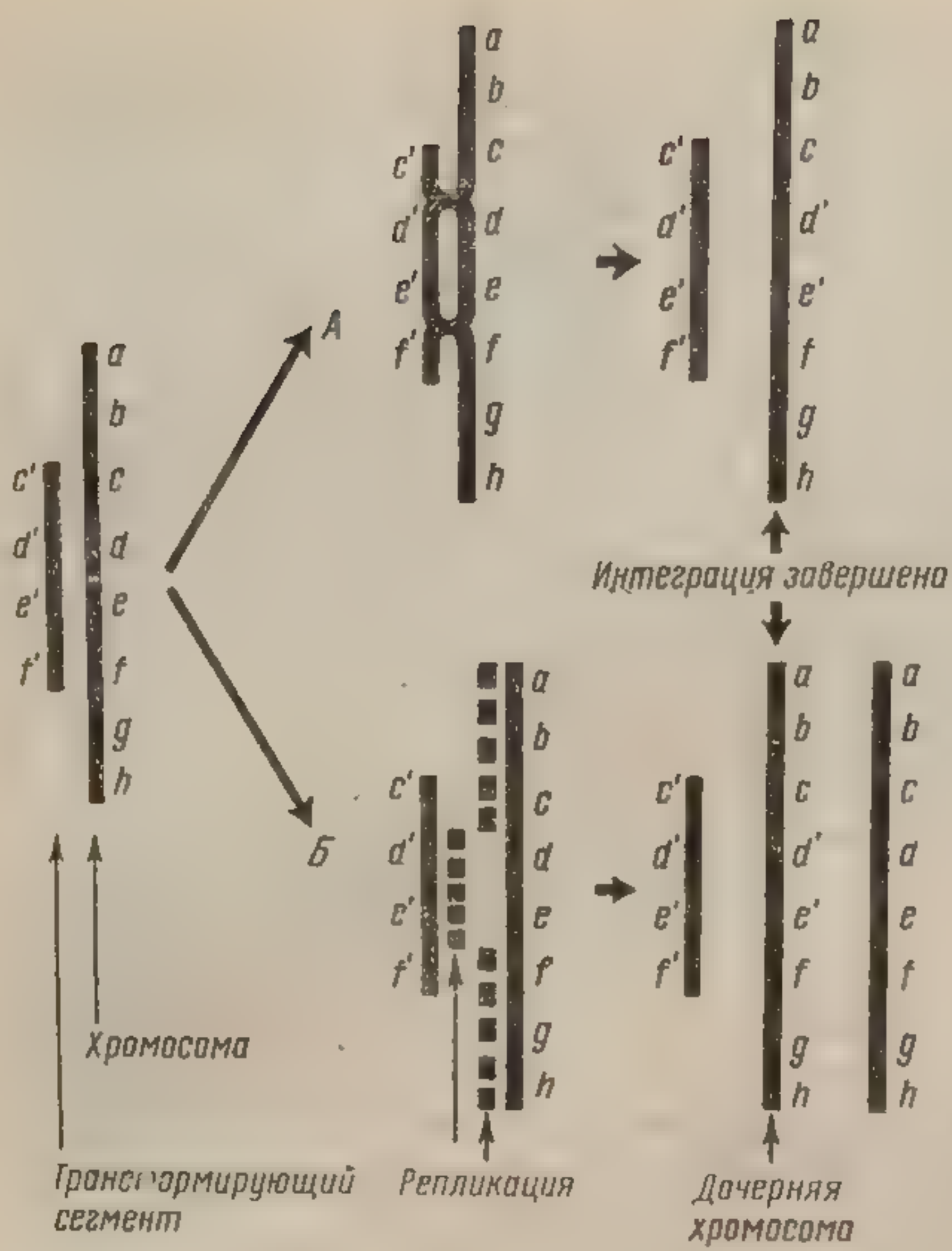


РИС. 22-5.

Предполагаемые механизмы включения сегмента генетической информации в хромосому хозяина путем разрывов (А) и путем выборочного копирования (Б)

кером, которые лишь в редких случаях могут быть разделены при фрагментации. Поэтому можно полагать, что проникающие частицы либо несут оба маркера, либо не несут ни одного из них, а невозможность получения 100% двойных трансформаций в первом случае обусловлена тем, что интегрируется только небольшая часть таких проникающих в клетку и спаривающихся фрагментов.

Включение части находящегося в состоянии синапсиса фрагмента может происходить двумя возможными способами (рис. 22—5). Первый способ представляет собой *выборочное копирование* (cory choice) (рис. 22—5). В этом случае дочерняя хромосома образуется в результате поочередного использования в качестве матрицы хромосомы реципиента и ДНК донора. Вновь образованная хромосома подобна исходной хромосоме, за исключением сегмента, образовавшегося при использовании в качестве матрицы трансформирующей ДНК. Ожидается, что рекомбинантная хромосома, образуемая по способу выборочного копирования, содержит полностью вновь синтезированную ДНК.

Второй способ основан на *разрыве и обмене* такого же типа, как при хромосомных перестройках или при кроссинговере. В этом случае (рис. 22—5, А) «разрывы» должны произойти с каждой стороны от включаемого маркера, в результате чего происходит «двойной кроссовер» (стр. 144). Хотя двойные кроссоверы на коротких участках между двумя гомологичными хромосомами высших организмов — чрезвычайно редкое событие, такого рода обмен может происходить при особых условиях и возможен между химически менее сложной хромосомой бактерии и более коротким сегментом трансформирующей ДНК. Соединение трансформирующей ДНК с маркерами реципиента не требует синтеза ДНК в области включения (М. Фох, 1962), хотя включаемый сегмент (длина которого соответствует, по крайней мере, длине цепи из 900 нуклеотидных пар), по-видимому, реплицируется синхронно с ДНК реципи-

ента. Опыты с использованием меченой ДНК показывают, что при трансформации в ДНК реципиента включается одновитчатая ДНК донора и что, вероятно, может включиться любая из нитей ДНК донора (O. Sid-diqi, 1963; M. Fox and M. Allen, 1964). Таким образом, факты согласуются с гипотезой о включении посредством разрыва.

Важно отметить, что часть проникшей в клетку, но не интегрированной ДНК донора, очевидно, не сохраняется в виде хромосомного генетического материала. Если включение идет по способу выборочного копирования, то трансформирующий сегмент также не сохраняется; если же включение происходит путем «разрыва — обмена», то не сохраняется замещаемый сегмент ДНК.

РЕКОМБИНАЦИЯ НИТЕЙ IN VITRO

Нагревание хромосомной ДНК вызывает ее денатурацию вследствие разделения нитей. После быстрого охлаждения образующиеся отдельные нити денатурированной ДНК могут сложиться, образуя значительное количество комплементарных пар оснований между основаниями, находящимися на различных уровнях отдельной цепи. При определенных условиях гомополимеры РНК, содержащие А, У, Ц или инозиновую кислоту, способны спариваться основаниями после складывания, в результате чего образуются правильные двуспиральные структуры. Чтобы понять синтез *de novo* и ограниченную реакцию *in vitro*, по-видимому, важно знать пределы, в которых происходит спаривание оснований одной нити в гомополимерах ДНК, содержащих Ц или Г. Как установили в 1961 г. Доти и соавторы, а также Мармур и Лейн, после нагревания пневмококковой ДНК в течение 10 мин. при 100°C практически все нити разъединены и все водородные связи разрушены; такая денатурация, названная *плавлением*, происходит быстро при достижении 71°C для *dAT* и 83°C для *dGdC*. Если ДНК, денатурированная нагреванием, медленно охлаждается, то происходит примерно только 70%-ная ренатурация нативной ДНК, хотя, согласно ожидаемому, *dAT* и *dGdC* дают 100%-ную ренатурацию.

Ренатурированная и нативная ДНК отличаются от денатурированной рядом свойств:

1. Ренатурированная ДНК выглядит под электронным микроскопом почти так же, как и нативная ДНК, тогда как денатурированная ДНК представляет собой беспорядочно скрученную структуру с гроздевидными участками.

2. Ренатурированная и нативная ДНК одинаковы по плотности и легче денатурированной ДНК.

3. Ренатурированная и нативная ДНК имеют примерно вдвое больший молекулярный вес, чем денатурированная ДНК.

4. Все виды ДНК имеют одинаковый спектр поглощения, однако ренатурированная и нативная ДНК поглощают меньшее количество ультрафиолетовых лучей, чем денатурированная ДНК.

На процесс ренатурации влияет ряд факторов.

1. *Концентрация ДНК в медленно охлаждающейся смеси.* При высокой концентрации отдельных нитей наблюдается высокий процент ренатурации, в то время как медленно охлаждаемая смесь, содержащая отдельные нити в низкой концентрации, фактически не образует двойных нитей.

2. *Концентрация солей.* Отрицательно заряженные фосфатные группы отдельных нитей имеют тенденцию предотвращать их соединение с другими нитями. Это препятствие может быть преодолено при добавлении к раствору KCl, который действует в качестве защиты от действия сил отталкивания между фосфатами. В определенных пределах чем больше

концентрация KCl, тем выше процент ренатурированной ДНК, получаемой при медленном охлаждении нагретой ДНК.

3. *Источник ДНК.* Допустим, что молекулярный вес нативной ДНК приблизительно одинаков у всех организмов. Тогда клетка млекопитающего, содержащая примерно в 1000 раз большее количество ядерной ДНК по сравнению с бактериальной клеткой, должна содержать примерно в 1000 раз больше молекул ДНК. Допустим также, что все молекулы ДНК в геноме отличаются последовательностью оснований. Тогда при определенной концентрации денатурированной ДНК количество комплементарных нитей в образце ДНК из тимуса телят должно быть в 1000 раз меньше, чем количество комплементарных нитей в образце ДНК пневмококка. Если растворы денатурируемой ДНК одинаковой концентрации нагреть до 80°C, то большая фракция бактериальной ДНК образует двойные нити, тогда как ДНК тимуса телят не образует заметных количеств аналогичной фракции. Следовательно, при ренатурации существенна концентрация комплементарных нитей.

ДНК может быть денатурирована *in vitro* с помощью большого числа органических химических веществ, включая мочевины, ароматические соединения и различные спирты. Эти данные, однако, не следует рассматривать как свидетельство того, что такие соединения выполняют ту же функцию *in vivo* или что они как-то причастны к сохранению нитей ДНК в состоянии двойной спирали *in vivo* или при обычных условиях *in vitro*.

При нагревании ДНК *in vitro* можно наблюдать другое изменение физико-химических свойств. Как уже указывалось, молекулярный вес нативной ДНК пневмококков примерно равен шести миллионам. При нагревании определенных препаратов такой нативной ДНК образуются отдельные нити, имеющие молекулярный вес менее половины этого значения. Такое уменьшение молекулярного веса может быть объяснено присутствием ДНКазы, загрязняющей препарат.

При разделении таких комплементарных нитей с помощью тепловой денатурации каждая отдельная нить оказывается фрагментированной.

Как уже упоминалось ранее, ДНК из разных источников и фрагменты ДНК разных размеров ведут себя по-разному на разных стадиях процесса трансформации. Если ДНК *in vitro* обработана ДНКазой в разных концентрациях, то сначала повреждаются отдельные нити двойной спирали и только позднее, когда обе нити будут повреждены примерно в одинаковых участках, молекула разъединяется (L. Lerman, L. Tolmach, 1957, 1960). В результате подобного *рассечения* образуются более мелкие молекулы ДНК, которые, как уже говорилось, слабо проникают в клетку реципиента. Даже повреждение только одной нити двойной спирали уменьшает способность к трансформации. Этот эффект отчасти объясняется неспособностью проникших молекул трансформировать клетку вследствие инактивации трансформирующего локуса или локуса, необходимого для синапсиса или интеграции.

У пневмококков денатурированная ДНК имеет незначительную трансформирующую активность. Молекулярная основа этого явления еще не определена. С другой стороны, трансформирующая способность ренатурированной ДНК может составлять 50% от способности нативной ДНК, взятой в эквивалентной концентрации. Увеличение концентрации ДНК и высокая ионная концентрация способствуют повышению как ее ренатурации, так и трансформирующей способности.

Если ренатурация осуществляется в смеси, содержащей N¹⁴ и N¹⁵ молекулы ДНК *E. coli*, то удастся получить гибридные молекулы. (Напомним, что такие синтетические молекулы могут быть определены по промежуточному положению, которое они занимают в ультрацентрифужной пробирке.) Гибридные молекулы могут быть также образованы между отдельными нитями ДНК различных видов, но только в тех случаях, когда

эти виды генетически близкородственны (о чем можно судить по возможности осуществления межвидовой трансформации), т. е. последовательность оснований в их ДНК весьма сходна. Молекулярные гибриды используются для сравнения последовательности оснований у близкородственных организмов, даже если генетическая рекомбинация между ними невозможна.

Следует указать дополнительно на следующие наблюдения.

1. Разделение нитей при нагревании завершается в течение нескольких минут. Интересно, происходит ли такое же быстрое разделение нитей *in vivo*? Предполагается, что в обычных условиях разделение нитей осуществляется с помощью фермента *развелазы*, точнее *анразвелазы* (*ungravelase*).

2. Обнаруженная способность к разделению и соединению отдельных нитей должна привести к лучшему пониманию трансформации, в частности, механизма интеграции.

3. Мельчайшие единицы рекомбинации генетического материала идентичны мельчайшим единицам ДНК, которые могут быть включены или замещены в геном реципиента при генетической трансформации.

Физические и химические свойства ДНК, возникшей вследствие экстенсивного синтеза *in vitro*, близки свойствам природной ДНК, используемой в качестве затравки-матрицы, и подобный синтез *in vitro* можно считать биологическим процессом. Однако не доказано, что такая ДНК обладает биологическими свойствами, т. е. функционирует генетически *in vivo*. При использовании трансформирующей ДНК в синтезе *in vitro* общая трансформирующая способность инкубационной смеси уменьшается с увеличением времени, в течение которого продолжается синтез. Возможно, что в препарате полимеразы присутствуют следы ДНКазы, которая снижает общую трансформирующую активность ДНК посредством нарушения целостности нитей ДНК, в результате чего трансформирующая способность ДНК утрачивается быстрее, чем увеличивается количество ДНК в процессе синтеза. Однако биологическая активность вновь синтезированной ДНК может быть определена путем дифференцированного маркирования старой и новой ДНК и отдельной проверки трансформирующей способности каждой из них. Например, нерадиоактивную ДНК, содержащую 5-бромурацил, используют в качестве затравки-матрицы для синтеза радиоактивной ДНК, не содержащей 5-бромурацила (R. Litman, W. Szybalski, 1963). После завершения синтеза осуществляется центрифугирование ДНК в градиенте плотности, в результате которого отделяется двунитчатая фракция, содержащая, по существу, всю вновь синтезированную ДНК (радиоактивная и обладающая меньшей плотностью, чем ДНК с 5-бромурацилом). Установлено, что эта новая ДНК способна трансформировать различные генетические локусы. Поскольку другие объяснения, по-видимому, исключаются, то можно считать доказанной возможность синтеза *in vitro* биологически активного генетического материала, т. е. функционально активных генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическая рекомбинация у бактерий и других организмов может осуществляться посредством генетической трансформации. У бактерий этот процесс включает последовательный ряд событий, в результате которых компетентные клетки сначала временно, а затем постоянно связываются с ДНК. Проникнув в клетку, ДНК, по-видимому, спаривается с соответствующим участком бактериального генома посредством процесса, подобного синапсису. Трансформация завершается, когда небольшой сегмент ДНК включается в геном клетки в результате замещения гомологичного сегмента хромосомы реципиента.

Трансформация дает прямое и окончательное доказательство того, что хромосомная ДНК — это генетический материал. У бактерий наименьшая рекомбинационная единица генетического материала соответствует наименьшей единице ДНК, включаемой или замещаемой при трансформации.

Разделение нитей ДНК и их рекомбинация *in vitro* сопровождаются соответственно денатурацией и ренатурацией ДНК.

Получены убедительные данные, согласно которым функционально активные гены, вводимые в бактериальные клетки при трансформации, могут быть синтезированы *in vitro*.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

22.1. Какое из свойств бактерий дает им наибольшее преимущество перед другими объектами генетических исследований?

22.2. Допустим, что все члены клона генетически идентичны. Может ли половой процесс влиять на результаты какого-либо эксперимента из описанных в этой главе? Объясните.

22.3. Чем отличаются между собой ауксотрофные и прототрофные бактерии?

22.4. Составьте план эксперимента по обнаружению мутагенного действия красителя акрифлавина на *E. coli*.

22.5. Сравните «хромосому» бактериальной клетки с хромосомой человека.

22.6. Правильно ли говорить о «бактериальной хромосомной ДНК»? Ведь бактерии не содержат типичных хромосом. Объясните.

22.7. Что подразумевается под интеграцией в генетике? Не пользуясь схемами, опишите механизмы, с помощью которых может происходить интеграция.

22.8. Перечислите те черты кроссинговера, которые трудно объяснить, исходя из механизма выборочного копирования.

22.9. Обсудите вопрос о генетическом контроле синтеза и деградации генов.

22.10. Разберите критически утверждение (стр. 13), согласно которому генетическая передача может осуществляться между особями только при образовании межклеточного моста.

22.11. Какие имеются основания для того, чтобы считать трансформацию формой генетической рекомбинации, а не мутацией? Вы согласны с такой интерпретацией? Почему?

22.12. Придумайте эксперимент, который позволил бы установить, действительно ли происходит разделение цепи во время экстенсивного синтеза *in vitro*.

22.13. Способствуют ли исследования по трансформации решению вопроса о ploидности пневмококков? Объясните.

22.14. Какого рода проблемы могли бы Вы исследовать, если бы владели методом изучения судьбы отдельных клеток, подвергшихся действию трансформирующей ДНК?

22.15. Что дают исследования по генетической трансформации для познания генетической природы сохраняемой и не сохраняемой хромосомной ДНК?

22.16. Скопируйте рис. 22—5, показывающий предполагаемую последовательность оснований в двунитчатой ДНК. Имеет ли Ваш рисунок какое-либо отношение к ответу на вопрос 22.8? Объясните.

22.17. Как Вы объясните данные (стр. 313) о том, что частота двойных трансформаций по определенным маркерам иногда несколько ниже, чем произведения частот двух соответствующих единичных трансформаций?

22.18. Межвидовая трансформация у бактерий происходит редко или отсутствует, когда реципиент и донор различаются по относительному

содержанию Г + Ц. Когда же содержание Г + Ц у них одинаково, может образовываться гибридная ДНК донора и реципиента, даже если межвидовая трансформация происходит редко. Обсудите значение данных о содержании Г + Ц, образовании гибридной ДНК и межвидовой трансформации для таксономических исследований бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

- E. O. Akinrimisi, C. Sander, P. O. P. Ts'o. Properties of Helical Polycytidylic Acid. — Biochemistry, 1963, 2, 340.
- O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. — J. Exptl. Med., 1944, 79, 137. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.), Boston, 1960, p. 147; and in: «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.), N. J., Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 173.
- P. Doty, J. Marmur, J. Eigner, C. Schildkraut. Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Physical Chemical Studies. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 461.
- H. Ephrussi-Taylor. Genetic Aspects of Transformations of *Pneumococci*. — Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1951, 16, 445.
- M. S. Fox. The Fate of Transforming Deoxyribonucleate Following Fixation by Transformable Bacteria, III. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1043.
- M. S. Fox, M. K. Allen. On the Mechanism of Deoxyribonucleate Integration in Pneumococcal Transformation. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 412.
- M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies. Helix Formation by Guanylic Acid. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 2013.
- R. M. Herriot. Formation of Heterozygotes by Annealing a Mixture of Transforming DNAs. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 146.
- R. D. Hotchkiss. Transfer of Penicillin Resistance in *Pneumococci* by the Desoxyribonucleate Derived from Resistant Cultures. — Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1951, 16, 457. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.), Boston, 1960, p. 169.
- B. H. Hoyer, B. J. McCarthy, E. T. Bolton. A Molecular Approach in the Systematics of Higher Organisms. — Science, 1964, 144, 959.
- L. S. Lerman, L. J. Tolmach. Genetic Transformation. I. Cellular Incorporation of DNA Accompanying Transformation in *Pneumococcus*. — Biochim. et biophys. acta, 1957, 26, 68. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.), Boston, 1960, p. 177.
- L. Levine, J. A. Gordon, W. P. Jenks. The Relationship of Structure to the Effectiveness of Denaturing Agents for Deoxyribonucleic Acid. — Biochemistry, 1963, 2, 168.
- R. M. Litman, W. Szybalski. Enzymatic Synthesis of Transforming DNA. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 473.
- J. Marmur, S. Falkow, M. Mandel. New Approaches to Bacterial Taxonomy. — Annual Rev. Microbiol., 1963, 17, 329.
- J. Marmur, D. Lane. Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Biological Studies. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 453.
- J. Marmur, R. Rownd, C. L. Schildkraut. Denaturation and Renaturation of Deoxyribonucleic Acid. — Progress in Nucleic Acid Res., 1963, 1, 231.
- A. W. Ravin. Experimental Approaches to the Study of Bacterial Phylogeny. — Amer. Naturalist, 1963, 97, 307.
- M. Roger. Fractionation of Pneumococcal DNA Following Selective Heat Denaturation: Enrichment of Transforming Activity for Aminopterin Resistance. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 189.
- O. H. Siddiqi. Incorporation of Parental DNA into Genetic Recombinants of *E. coli*. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 589; *ibid.*, 50, 581.
- E. H. Szybalska, W. Szybalski. Genetics of Human Cell Lines. IV. DNA-Mediated Heritable Transformation of a Biochemical Trait. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 2026.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ И КОНЬЮГАЦИЯ

МУТАЦИИ

Практически все мутации, возникающие после обработки мутагенным фактором, имеют неадаптивные или нежелательные для организма фенотипические проявления (глава 16). Вредные проявления этих мутаций явно не зависят от присутствия мутагена в среде. Подобным же образом многие из редких мутаций, увеличивающих приспособляемость организма, остаются полезными в отсутствие мутагена, индуцировавшего их. В редких случаях, однако, мутагенный фактор (например, рентгеновы лучи) индуцирует возникновение мутанта, имеющего адаптивное преимущество в присутствии мутагена (например, устойчивость к действию рентгеновых лучей, вызывающих генетические или иные повреждения). Возникает ли такой адаптивный мутант случайно или его появление обусловлено генетическим изменением в ответ на воздействие мутагена? Подобный же вопрос возникает при изучении адаптивных мутантов, возникающих «спонтанно». Появляются ли эти мутанты в результате адаптивного генетического изменения в ответ на воздействие какими-то неизвестными факторами окружающей среды?

Такую общую проблему можно рассмотреть, используя определенный штамм *E. coli*, который, по-видимому, никогда не подвергался воздействию лекарственного препарата стрептомицина. Если такой штамм высеять на агар, содержащий стрептомицин, то почти все особи окажутся неспособными к росту и образованию колоний; они *стрептомициночувствительны*. Однако примерно 1 бактерия из 10 миллионов растет на этой среде и образует колонию, состоящую из *стрептомициноустойчивых* клеток, что свидетельствует о передаче устойчивости дочерним клеткам. Возникает ли адаптивный устойчивый мутант в ответ на воздействие стрептомицина, который вызывает направленную мутацию? Или же стрептомициноустойчивые мутанты возникают в отсутствие стрептомицина, спонтанно, а стрептомицин действует только как селективный фактор, отбирающий предсуществующие устойчивые мутанты? Или, может быть, верны оба объяснения? Формулируя проблему в более общих чертах, вопрос следует поставить следующим образом: следует ли считать мутанты, устойчивые к воздействию, *постадаптивными* (возникшими после воздействия), или *преадаптивными* (уже присутствующими перед воздействием), или же встречаются оба типа мутантов?

Вполне очевидно, что необходимость воздействия на особей каким-либо из исследуемых факторов — в данном случае стрептомицином — делает неубедительными результаты подобных опытов, ибо при таких условиях невозможно решить, имеет ли мутант постадаптивное или преадаптивное происхождение. Однако эту трудность удастся преодолеть. Если стрептомициноустойчивые мутанты преадаптивны, то они должны встречаться и в отсутствие антибиотика и давать начало клонам, все особи которых устойчивы. Следует снова указать, что мутация с возникновением стрептомициноустойчивости, какое бы происхождение она ни имела, — событие очень редкое. Поэтому нужно вырастить около 10 миллионов клонов на агаре, не содержащем стрептомицина, и проверить каждый клон на стрептомициноустойчивость путем пересева образца каждого из

них на ср
пересева
антибиоти
то, вернул
не подвер
образцы,
постадап
мутацию н
любые дру
Сущест

ного прои
При испол
стрептоми
его на агар
образец ка
ной полосе
на нет, как
но достаточ
будет также

Если ст
ждению, то
так как ос
начально ч
ожидать во
Другие обр
ченный рос
мутация пр
таким же ст
устойчивых
вых особей.
но возникш
будет счита
образцы это
стрептомици

Учитыва
ночувствите
что этим ме
адаптивна
метод много
бактерий.)

Второй м
основан на
E. Lederberg
клеток одно

Рис. 23-1.
Стрептоми
и стрепто
E. coli, с
вом посева

них на среду, содержащую стрептомицин! Ожидается, что после такого пересева часть клона или весь клон окажется устойчивым к действию антибиотика. Если устойчивость обусловлена преадаптивной мутацией, то, вернувшись к соответствующему исходному клону, который никогда не подвергался воздействию стрептомицина, удастся получить другие образцы, которые также будут устойчивыми. Если же мутант имеет постадаптивное происхождение, то другие образцы исходного клона дадут мутацию к устойчивости с той же вероятностью, с какой ее могут дать любые другие образцы из любых других клонов.

Существуют три метода установления преадаптивного и постадаптивного происхождения мутантов с использованием *клональных образцов*. При использовании первого метода выращивают один (предположительно) стрептомициночувствительный клон в жидкой среде и затем рассеивают его на агаре для образования большого числа отдельных колоний. Затем образец каждой колонии наносят на агар в виде полосы, перпендикулярной полосе в слое агара, содержащей стрептомицин. Там, где стрептомицина нет, каждый бактериальный штрих дает рост на агаре и, если проверено достаточное количество клонов, то по крайней мере один из штрихов будет также расти в зоне стрептомицина (рис. 23-1).

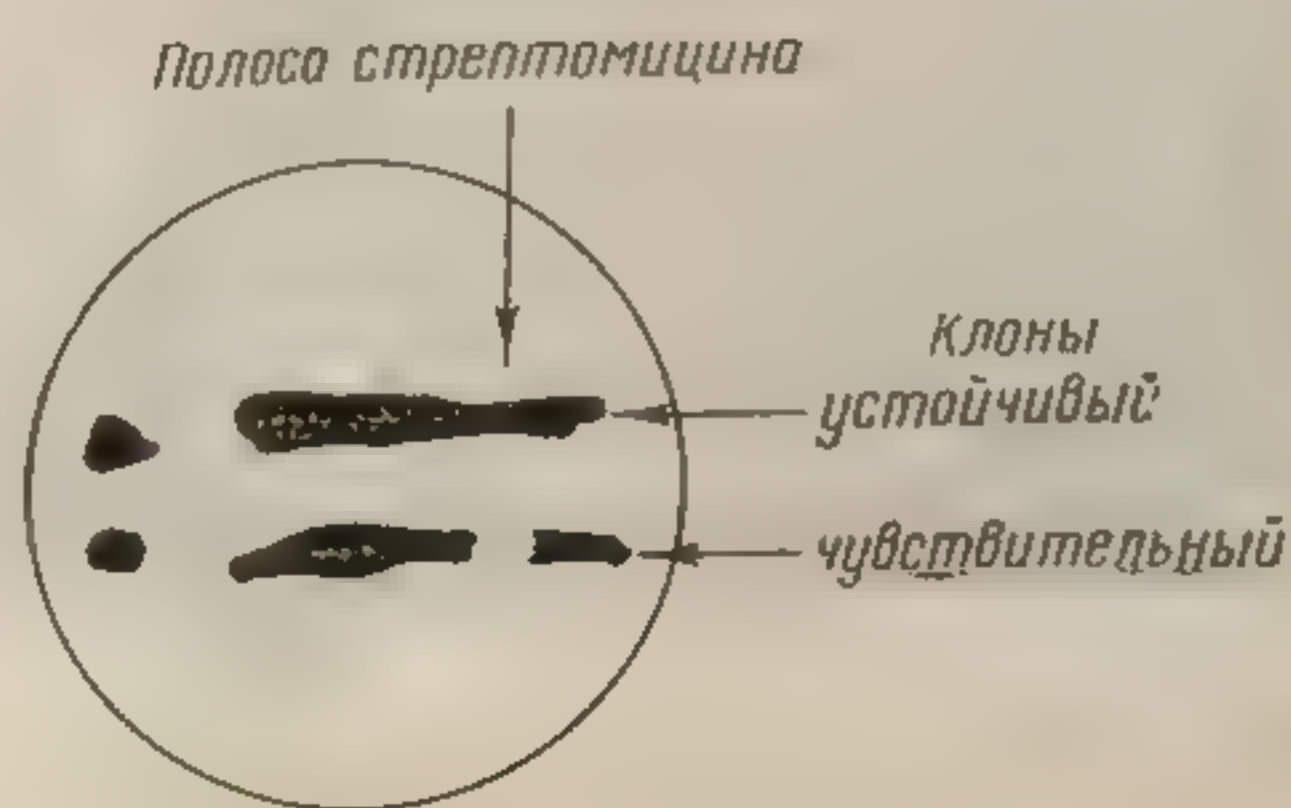
Если стрептомициноустойчивые мутанты постадаптивны по происхождению, то в зоне стрептомицина полоса роста должна резко прерваться, так как особи клона, посеянного поперек зоны стрептомицина, первоначально чувствительны к стрептомицину и лишь в редких случаях можно ожидать возникновения постадаптивной мутации сразу не в одной клетке. Другие образцы, взятые из того же клона, будут давать столь же ограниченный рост на стрептомицине, как и первый образец. Если же изучаемая мутация преадаптивна, то рост в зоне стрептомицина должен быть почти таким же сплошным, как и после пересева на стрептомицин чистого клона устойчивых бактерий или смеси бактерий с высоким процентом устойчивых особей. Тот факт, что родительский клон представляет собой спонтанно возникший преадаптивный стрептомициноустойчивый мутантный клон, будет считаться окончательно доказанным в том случае, если другие образцы этого клона также смогут хорошо расти, будучи посеянными на стрептомицин.

Учитывая редкость появления в этом штамме мутации от стрептомициночувствительности к устойчивости (1 на 10^7 клеток), следует признать, что этим методом практически невозможно установить, пре- или постадаптивна стрептомициноустойчивость мутантов. (Тем не менее, этот метод многократно использовали в других исследованиях генетики бактерий.)

Второй метод, который может быть использован для проверки клонов, основан на использовании *отпечатков* (replica plating; J. Lederberg, E. Lederberg). Как и в первом случае, эту процедуру начинают с посева клеток одного клона в чашках Петри на агаре, не содержащем стрептоми-

РИС. 23-1.

Стрептомициночувствительные и стрептомициноустойчивые клоны *E. coli*, определяемые при штриховом посеве отдельных клонов



цина. После инкубации в чашке образуется около тысячи колоний. Накладывая эту *исходную чашку* на ворс бархата и слегка прижимая ее к ткани, можно получить образцы почти всех колоний одновременно. Бархат, ворс которого захватывает от 10 до 30% каждой колонии, используется для перенесения соответствующего образца колоний на серию *чашек-отпечатков* (рис. 23—2). Предварительные контрольные опыты показывают, что с помощью бархата можно сделать несколько хороших отпечатков с исходной чашки; таким способом могут быть «перепечатаны» как устойчивые, так и чувствительные к стрептомицину клоны. Первая копия делается на среде, не содержащей стрептомицина, тогда как вторая и последующие — на чашках, содержащих стрептомицин; в них колонии, естественно, будут образованы только стрептомициноустойчивыми бактериями. Если верна гипотеза о постадаптивном возникновении мутантов, то вероятность роста клеток из одной колонии на двух отпечатках в присутствии стрептомицина и вероятность роста двух колоний на одном отпечатке одинаковы. Другими словами, расположение устойчивых колоний на разных отпечатках будет случайным. Если же мутанты преадаптивны, то все отпечатки устойчивых колоний должны строго совпадать (хотя могут быть и исключения: иногда бархатный штамп не может передать часть одних и тех же колоний на каждую из чашек-отпечатков). Естественно, что так же легко можно найти устойчивую колонию в соответствующем положении и на исходной чашке. Несмотря на то что эта методика перепечатки клонов удобна для многих других целей, она еще слишком трудоемка для проверки пре- или постадаптационных гипотез, ибо для нахождения одного клонального мутанта, отличающегося стрептомицинорезистентностью, необходимо сделать отпечатки примерно с 10 тысяч чашек.

Эту трудность можно преодолеть при использовании третьего метода для проверки клонов, который включает перепечатку соприкасающихся колоний. В этом случае на агар, не содержащий антибиотик, может быть посеяно около миллиарда бактерий (из стрептомициночувствительного клона). Они будут образовывать мелкие колонии, настолько тесно соприкасающиеся друг с другом, что они растут вместе и образуют *бактериальный газон* (рис. 23—3, А). Тем не менее, можно сделать отпечаток такого газона на стрептомициновом агаре. Такой отпечаток будет давать рост в том месте, где имеются устойчивые к антибиотику мутанты (рис. 23—3, Б,



РИС. 23-2

Отпечатки отдельных колоний (справа), сделанные с исходной чашки (слева) (по N. Melechen)

В, Г). За
и получи
такие обр
случайно
участкам
доказана
эксперим
богаче му
чем в учас
мутантны
щих поло
тельно, б
Другие э
цина почт
преадапти
чивых мут
же резуль
вать и сде
обнаружи
до его воз
Большин
мутаций.
около мил

РИС. 23-4
Схема исп
тода отпе
ределения
мутаций у
На отпечат
ция к T⁺, в
одна мутаци
печатке 2' —
к R^a+

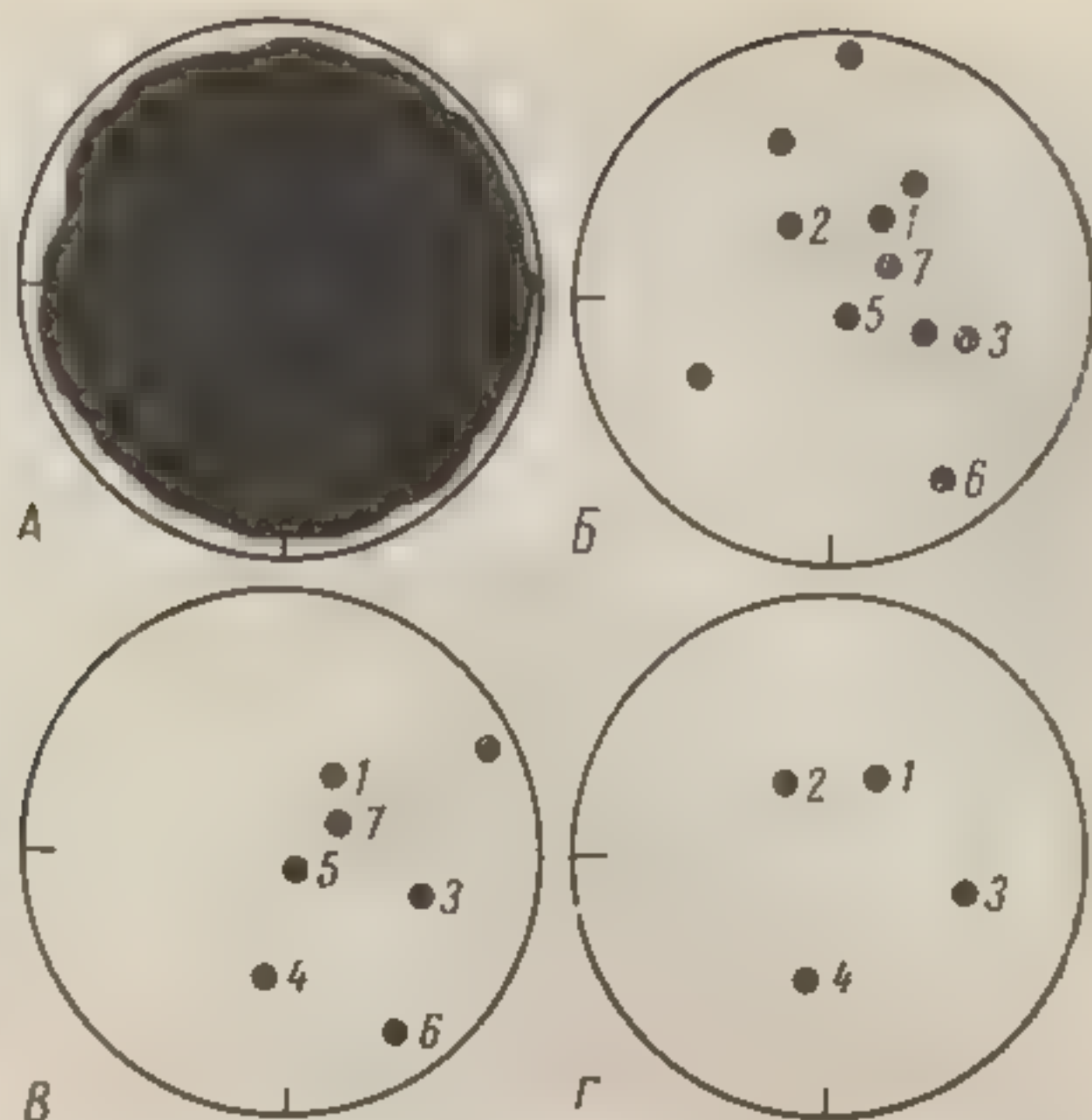


РИС. 23-3.

Отпечатки бактериального газона для определения стрептомициноустойчивых мутантов (по J. Lederberg и E. Lederberg)

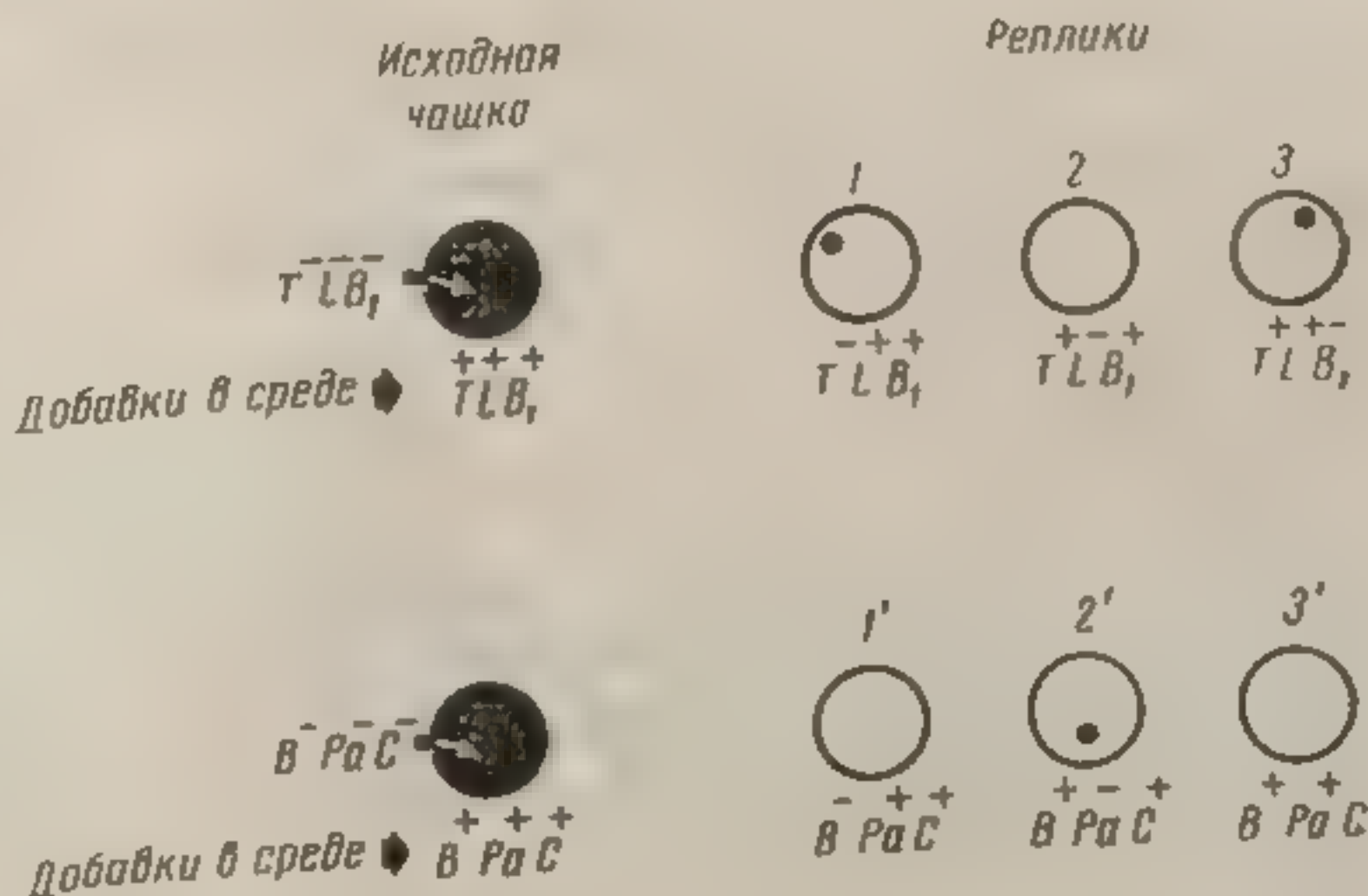
В, Г). Затем можно вернуться к соответствующему участку исходной чашки и получить образцы для проверки на устойчивость к антибиотику. Если такие образцы не богаче устойчивыми мутантами, чем образцы из других случайно выбранных участков исходной чашки (соответствующих тем участкам, которые не дают роста ни на одном из отпечатков), то будет доказана гипотеза о постадаптивном возникновении мутантов. Такой эксперимент был осуществлен, и оказалось, что исходная чашка гораздо богаче мутантами в участках, соответствующих мутантным на отпечатках, чем в участках, которые на отпечатках не содержали мутантов. Более того, мутантные клоны имеют тенденцию к образованию роста в соответствующих положениях на всех чашках с отпечатками (рис. 23—3, В—Г). Следовательно, большинство мутантов по происхождению явно преадаптивны. Другие эксперименты доказывают окончательно, что в случае стрептомицина почти все (если не все) мутанты, устойчивые к действию антибиотика, преадаптивны, т. е. стрептомицин не индуцирует возникновения устойчивых мутантов в количестве, поддающемся определению. Поскольку такие результаты получены и с хлорамфениколом, их можно экстраполировать и сделать вывод о том, что, как правило, устойчивые мутанты, обнаруживаемые на среде с каким-либо препаратом, возникают спонтанно до его воздействия и, следовательно, преадаптивны по происхождению.

Большие количества бактерий могут быть легко проверены на наличие мутаций. Например, на агар, содержащий антибиотик, можно рассеять около миллиарда чувствительных к нему бактериальных клеток и опреде-

РИС. 23-4.

Схема использования метода отпечатков для определения спонтанных мутаций у *E. coli*.

На отпечатке 1 видна мутация к T^+ , на отпечатке 3 — одна мутация к B_1^+ и на отпечатке 2' — одна мутация к Ra^+



лить число устойчивых клеток по числу образующихся колоний. Число мутаций к прототрофности может быть также определено путем рассева ауксотрофов на агар, не содержащий необходимого для их роста фактора, и подсчета числа образующихся колоний. Однако для получения данных о частоте мутирования необходимо установить число мутантов на единицу события. У многоклеточных организмов частота мутирования выражается обычно в мутациях на клетку, особь или поколение. Это также может быть применено и к бактериям. Так, частота мутаций от стрептомициночувствительности к устойчивости в одном определенном штамме *E. coli* (не в том, который использовали в экспериментах, рассмотренных выше) равна 1 мутации на миллиард бактерий. Это одна из самых низких частот мутирования, которую когда-либо удавалось измерить для какого-либо организма.

Иногда желательно, чтобы частота мутаций была выражена в мутациях на единицу времени, например, при описании нарастания мутаций, наблюдаемого при созревании сперматид или сперматозоидов у дрозофилы (глава 14). В случае бактерий возможны значительные колебания длительности времени, необходимого для завершения генерации. При колебании времени генерации от 37 минут до 2 часов естественно ожидать, что, чем короче время генерации, тем выше частота мутирования в час. Если время генерации увеличено от 2 до 12 часов, частота возникновения мутаций в час постоянна — каждый час задержки дает увеличение числа мутантов примерно на одно и то же количество. (Таким образом, при колебании времени генераций от 2 до 12 часов наблюдается линейное увеличение числа мутантов на генерацию.) Наконец, даже в тех случаях, когда время генерации увеличено от 12 часов до бесконечности (при изучении неделящихся клеток, сохраняющих жизнеспособность в среде, которая содержит источник энергии), удастся также обнаружить некоторое количество мутантов.

Вполне очевидно, поэтому, что лучший способ определения частоты мутаций — это определение числа мутаций на клетку (или особь) за единицу времени. Однако в тех случаях, когда каждый из циклов деления или каждая генерация занимает один и тот же период времени (что наблюдается у бактерий при оптимальных условиях культивирования), частота мутаций обычно измеряется на одну генерацию, служащую как бы единицей времени.

КОНЪЮГАЦИЯ

Генетическая рекомбинация у бактерий может осуществляться посредством генетической трансформации. Для трансформации характерны две черты, которые не рассматривались при обсуждении генетической рекомбинации у многоклеточных организмов.

1. ДНК донора проникает в клетку реципиента без участия какого-либо другого организма, что подтверждается инфекционностью чистой ДНК. В трансформации действительно участвует генетический материал двух разных клеток, однако ее нельзя считать типичным половым процессом, поскольку ее осуществление не зависит от контакта между клетками донора и реципиента.

2. Процесс интеграции, ведущий к генетической рекомбинации, нуждается в присутствии только части генома клетки донора. (В результате лишь небольшой сегмент проникшей ДНК донора замещает небольшой гомологичный сегмент генома реципиента.)

По-видимому, можно считать вполне обоснованной гипотезу, согласно которой любая гомологичная ДНК, проникшая в бактериальную клетку, может включиться в ее геном с помощью механизма, участвующего в трансформации. Несомненно, могут существовать и другие способы введения ДНК в клетку. Поэтому нам следует рассмотреть эксперименты, с помо-

щью которых можно узнать, передается ли ДНК из одной бактериальной клетки в другую, когда эти клетки контактируют друг с другом.

Один из таких экспериментов Ледерберг и Татум (1946) провели следующим образом: на прототрофный штамм (K12) *E. coli* воздействовали мутагеном (рентгеновыми или ультрафиолетовыми лучами) для получения отдельных ауксотрофных мутантов, которые не растут без тех или иных добавочных факторов, входящих в состав питательной среды. Воздействие мутагеном повторяется, причем сначала используют мутанты, ауксотрофные в отношении одного фактора роста, а затем и двойные ауксотрофы и, в конце концов, получают две линии, которые отличаются друг от друга тремя мутациями ауксотрофности, причем все шесть мутаций возникают независимо. Один из тройных мутантных штаммов ауксотрофен в отношении треонина (T^-), лейцина (L^-) и тиамина (B_1^-); другой тройной мутант ауксотрофен в отношении биотина (B^-), фенилаланина (Pa^-) и цистина (C^-). Генотипы этих двух линий могут быть записаны, как $T^-L^-B_1^-B^+Pa^+C^+$ и $T^+L^+B_1^+B^-Pa^-C^-$ соответственно.

Чистые линии выращивают отдельно на жидкой полноценной культуральной среде, т. е. на среде, содержащей все факторы, необходимые для роста и репродукции. Для образования бактериального газона на полноценную агаровую среду высевают около 10^8 бактерий одной линии. Затем делают три отпечатка для линии $T^-L^-B_1^-$ (рис. 23—4) на чашки, каждая из которых содержит полноценную среду без одного из требуемых факторов роста (T , L и B_1 соответственно). Иногда на сделанных отпечатках появляется клон, способный к росту: преадаптивный мутант образует этот клон, прототрофный в отношении фактора, отсутствующего в среде. Однако рост такого клона не обнаруживается в соответствующих положениях на всех трех средах (или даже двух) с частотой, превышающей случайное совпадение. Такой же результат получают при проверке того же количества бактерий линии $B^-Pa^-C^-$, рассеваемых на полноценной среде и проверяемых тем же методом отпечатков. Поэтому можно заключить, что в редких случаях действительно встречаются отдельные мутации к прототрофности в отношении одного питательного фактора: однако двойные или тройные мутации не встречаются с частотой, поддающейся определению.

В другом опыте точно повторяется предшествующий эксперимент с тем лишь отличием, что одинаковые количества двух тройных мутантов смешиваются в жидкой среде перед рассевом на полноценную агаровую среду. В этом случае (рис. 23—5) делают шесть отпечатков на чашки, содержащие полноценную среду, лишенную ряда компонентов: в первых трех случаях в ней отсутствуют B , Pa и C и, кроме того, один из трех компонентов: T или L или B_1 ; в других трех — отсутствуют T , L и B_1 , а также один из трех компонентов, B_1 , Pa или C . Особи $T^-L^-B_1^-$ не способны расти на первых трех упомянутых средах из-за отсутствия одного из требуемых для их роста компонентов и не способны расти на последних трех из-за отсутствия всех трех необходимых компонентов. Особи $B^-Pa^-C^-$ не растут на первых трех средах из-за того, что все три необходимых для их роста компонента отсутствуют и не могут вырасти на последних трех, так как отсутствует один из них. Если исходная чашка содержит преадаптивный мутант в отношении одного из локусов, определяющих зависимость от состава питательной среды, то только на одной из шести чашек, содержащих отпечатки, образуется колония. Например, если на исходной чашке возникнет среди $T^-L^-B_1^-$ клеток T^+ -мутант, то такой клон будет расти только на чашке со средой, лишенной B , Pa , C и T . В самом деле, на чашках с отпечатками обнаруживается рост примерно в 100 различных участках. Это количество значительно превышает число участков роста на шести средах с отпечатками двух линий, рассеянных по отдельности. В данном случае некоторые варианты растут только на одной из шести сред. Однако во многих случаях рост появляется сразу на двух средах;

такие растущие на двух средах варианты должны были приобрести независимость от состава питательной среды по двум локусам. Наконец, обнаружено много таких вариантов, которые растут на всех шести средах, что свидетельствует об их полной прототрофности ($T^- L^- B_1^- B^- Pa^+ C^-$). Исследование таких клонов на отпечатках и на исходной чашке показывает, что эти изменения преадаптивны и передаются из поколения в поколение. Оказалось, что независимость от факторов питательной среды этих чистых клонов возникает не в результате какой-либо физической связи между двумя или более различными ауксотрофами. Тот факт, что на средах с отпечатками возникает большое количество клонов, среди которых многие полностью прототрофны или ауксотрофны в отношении только одного фактора роста, доказывает, что эти результаты не обусловлены спонтанным мутированием. По-видимому, они возникают вследствие своеобразной генетической рекомбинации.

Может ли такая генетическая рекомбинация быть результатом трансформации? Напомним, что в большинстве случаев трансформируется только один локус и что частота двойных трансформаций значительно ниже, чем частота единичных трансформаций, даже в тех случаях, когда локусы, по-видимому, очень тесно сцеплены. Тем не менее, в описанном эксперименте двойные рекомбинанты обнаруживаются часто. Так, определенные рекомбинанты в отношении двух локусов (например $T^- L^- B_1^- B^- Pa^+ C^-$) встречаются чаще, чем рекомбинации по одному из этих локусов ($T^- L^- B_1^- B^- Pa^+ C^-$ и $T^- L^- B_1^- B^- Pa^- C^-$). Еще труднее объяснить трансформацией большое количество в этих опытах тройных рекомбинантов — полных прототрофов. Некоторые дополнительные эксперименты предназначены для проверки правильности такого объяснения. Показано, что ряд прототрофов, полученных в результате рекомбинации, возникает независимо от присутствия ДНКазы в среде, в которой бактерии смешивают или на которую их рассеивают. Трансформация не происходит, если одну культуру *E. coli* обрабатывают фильтратом или аутолизатом другой. Следовательно, генетическая рекомбинация у *E. coli* не обусловлена трансформацией.

В другом эксперименте использовали U-образную трубку, разделенную фильтром из пористого стекла на две части. В такую U-образную трубку добавляют бульон, а в каждое из ее колен вносят один из двух отличающихся штаммов. Питательная среда и растворимые вещества, а также мелкие частицы (включая вирусы), могут свободно проходить через пористое стекло, действующее только как бактериальный фильтр. Тем не

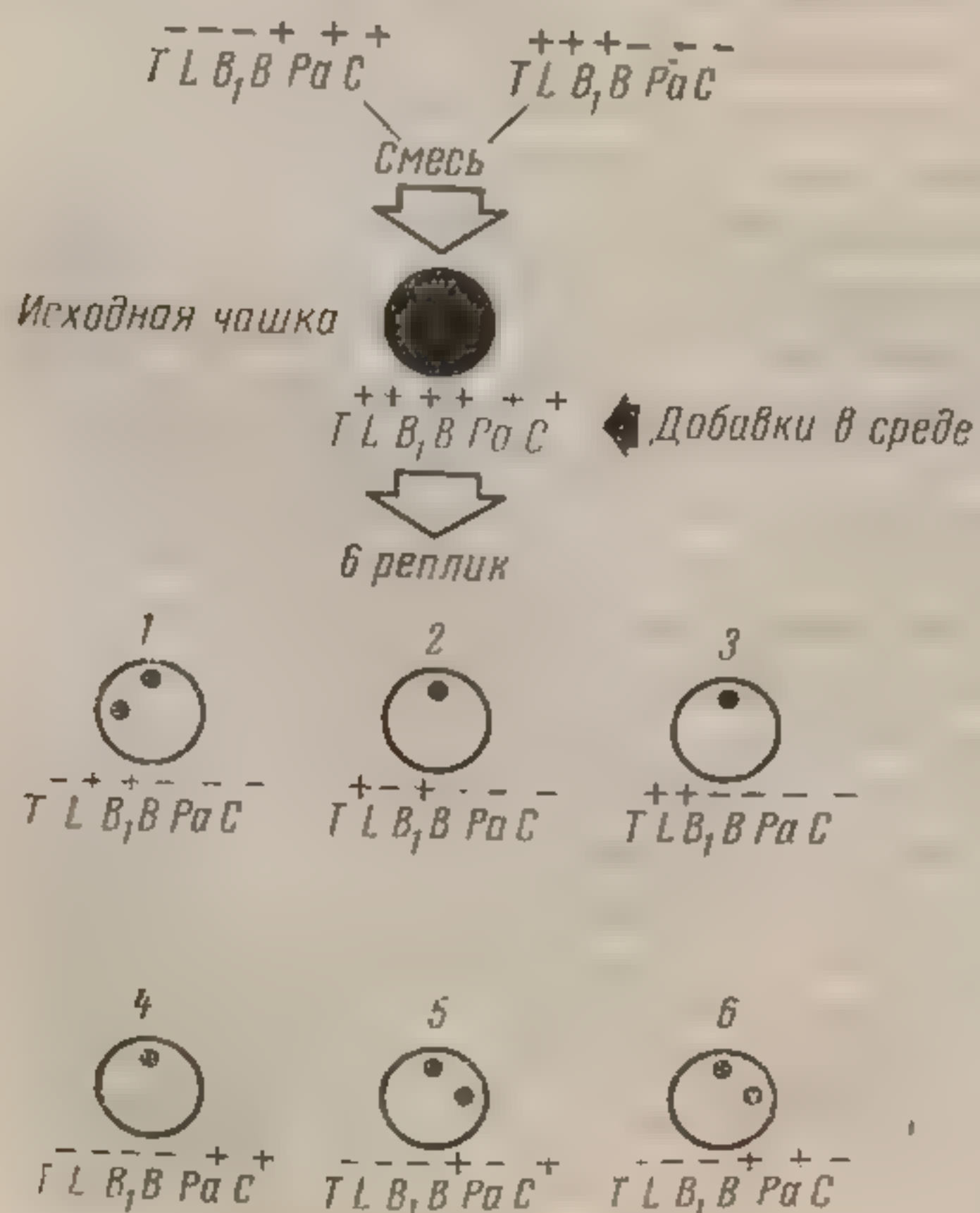


РИС. 23-5.

Схема использования метода отпечатков для определения генетической рекомбинации у *E. coli*.

Полностью прототрофный рекомбинант найден на всех отпечатках в положении на чашке, соответствующем положению цифры 12 на циферблате часов. Рекомбинант в отношении маркеров *Pa* и *C* найден на отпечатках 5 и 6 (в положении, соответствующем цифре 3 циферблата). Отпечаток 1 несет клон (растущий в положении, соответствующем цифре 9), который может быть обусловлен либо рекомбинацией, либо мутацией к T^+

менее в высевах, сделанных соответственно из каждого колена трубки, рекомбинанты не были обнаружены. Следовательно, можно заключить, что генетическая рекомбинация в этих опытах не обусловлена трансформацией. Она также не зависит от присутствия вируса. Кроме того, при рассеивании смеси трех различных мутантных линий K12 возникновение различных рекомбинантов можно считать результатом рекомбинации между любыми двумя линиями; особей, рекомбинантных в отношении маркеров всех трех линий, обнаружено не было. Очевидно, подобный тип генетической рекомбинации зависит от конъюгации, т. е. от клеточного контакта между спаренными бактериями, и его следует рассматривать как половой процесс.

Частота половой рекомбинации в первом описанном эксперименте не превышает 1 на миллион клеток (100 клонов рекомбинантов на 100 миллионов бактерий, рассеянных на исходной чашке). Незначительная частота встречаемости такого события делает совершенно бесполезными микроскопические поиски доказательств спаривания бактерий. (Значение нового явления не следует оценивать по частоте его встречаемости в экспериментах, впервые обнаруживших это явление. Напомним, например, что количество ДНК, впервые синтезированной *in vitro*, было чрезвычайно малым по сравнению с количествами, синтезируемыми теперь; то же самое можно сказать о трансформации. Частота ее, наблюдаемая вначале, была значительно меньше той (10—25%), которая может быть получена сегодня благодаря модифицированным методам.)

Тип питательной среды, используемой в описываемом эксперименте, позволяет отбирать только определенные типы рекомбинантов. В первом рекомбинационном эксперименте отбирались только *селектируемые маркеры* (только те аллели, которые обеспечивают независимость от определенных факторов питательной среды). Так, можно отобрать прототроф $T^+ L^+ B_1^+ B^- Pa^+ C^-$, хотя определить встречаемость комплементарного полнауксотрофа $T^- L^- B_1^- B^- Pa^- C^-$ не представляется возможным. Поскольку проверить встречаемость множественного ауксотрофа не удастся, его существование можно вообще подвергнуть сомнению. Предполагается, что первый результат спаривания — это образование зиготы, содержащей первый результат спаривания — это образование зиготы, содержащей частично или полностью генотипы родительских клеток. Предполагается, что при этом, как и в случае трансформации, происходит интеграция ДНК (если ДНК переходит от одного партнера к другому при спаривании). Однако долгое время не было получено доказательств правильности этого предположения. Другими словами, сохранялась вероятность того, что рекомбинант, образуемый при конъюгации, может быть диплоидом (частичным или полным), по крайней мере, в отношении генов, которых коснулась рекомбинация.

Обнаружить зиготу под микроскопом практически невозможно. Однако ее можно изучить генетически. После скрещивания некоторые клоны ведут себя так, как если бы они были мозаичными в отношении ряда маркеров. Если из таких клонов выделить отдельную клетку, вырастить из нее клон и затем исследовать его, то окажется, что какая-то часть потомства этой клетки обладает исходным генотипом какого-либо из родителей, а другая часть представляет собой продукт рекомбинации (J. Lederberg а. M. Zelle). Ясно, что такие отдельные клетки происходят от более или менее устойчивых гетерозигот — особей, диплоидных в отношении разных маркеров. Обнаружение гаплоидных рекомбинантов внутри такого клона служит несомненным доказательством их происхождения от истинной зиготы. Гаплоидные рекомбинанты получили название *сегрегантов*, однако это не значит, что они являются продуктами мейотического процесса. Полагают, что диплоидная зигота (частичная или полная), образуемая после бактериальной конъюгации, обычно существует лишь временно, как и в случае трансформации, лишь до тех пор, пока не образуется гаплоидное потомство.

Другими словами, все гены в ядерной зоне *E. coli* обычно гаплоидны.

Наряду с определенными генетическими маркерами, используемыми в качестве селективируемых (например, для определения рекомбинантных прототрофов), в клетках могут присутствовать и другие маркеры, которые не подвергаются селекции. Такие маркеры получили название *неселективируемых*. Можно получить *E. coli* в двух генетических формах: V_1^r устойчива к инфекции бактериальными вирусами T_1 и T_2 ; V_1^s чувствительна к инфекции этими вирусами. Инфекция сопровождается гибелью бактериальных клеток. Используя этот маркер и ауксотрофные мутации P^- (пролин-зависимость) и M^- (метионин-зависимость), можно провести скрещивание $B^- M^- P^+ T^+ V_1^r \times B^+ M^+ P^- T^- V_1^s$ и отобрать прототрофы $B^+ M^+ P^+ T^+$. Так как используемая среда не содержит вируса, локус V_1 используется в качестве неселективируемого маркера (J. Lederberg, 1947).

В результате скрещивания получен ряд прототрофов, которые проверены в отношении устойчивости и чувствительности к вирусу T_1 . 86% полученных прототрофов устойчивы (V_1^r), и 14% — чувствительны (V_1^s) (рис. 23—6). Следует подчеркнуть, что обе эти формы рекомбинантны в отношении маркеров прототрофности. При проведении реципрокного скрещивания V_1^r входит с родителем $B^+ M^+ P^- T^-$, а V_1^s — с родителем $B^- M^- P^+ T^+$. В этом случае обнаруживается обратное процентное соотношение прототрофов, чувствительных и устойчивых к T_1 . Другими словами, родительский штамм, передающий прототрофу P^+ и T^+ , передает также и V_1^s локус, в результате чего 79—86% прототрофов чувствительны к T_1 . Неравенство частот устойчивых и чувствительных особей среди прототрофов (т. е. отсутствие соотношения 50% : 50%) и их перестановка в случае перестановки V_1 маркера в родительских клетках доказывает, что интеграция и сегрегация V_1 локуса не происходит независимо от других маркеров, с которыми он входит в зиготу и которые позже присутствуют в гаплоидном прототрофе. Поэтому V_1 должен быть сцеплен с P и T и расщепление между этими локусами (или отсутствие совместной интеграции с ними) встречается примерно лишь в 20% случаев.

Можно обнаружить также сцепление ауксотрофных маркеров в скрещивании $T^+ L^+ B_1^- B^- \times T^- L^- B_1^+ B^+$, проводимом на полноценной среде; смесь засевают также на полноценную среду и с нее делают четыре отпечатка на полноценные среды без T (или без L , или без B_1 , или без B). В результате прототрофные рекомбинанты растут на всех четырех средах, ауксотрофы в отношении одного фактора роста — на трех средах, тогда как двойные ауксотрофы растут на двух средах. Прототрофы встречаются чаще, чем $T^+ L^- B_1^+ B^+$ или $T^- L^+ B_1^- B^-$; следовательно, T и L должны быть сцеплены. Дальнейшим анализом результатов экспериментов, в которых использованы другие маркеры, показано, что все изученные генетические маркеры *E. coli* сцеплены друг с другом и на карте могут быть расположены в линейном порядке, соответственно их рекомбина-

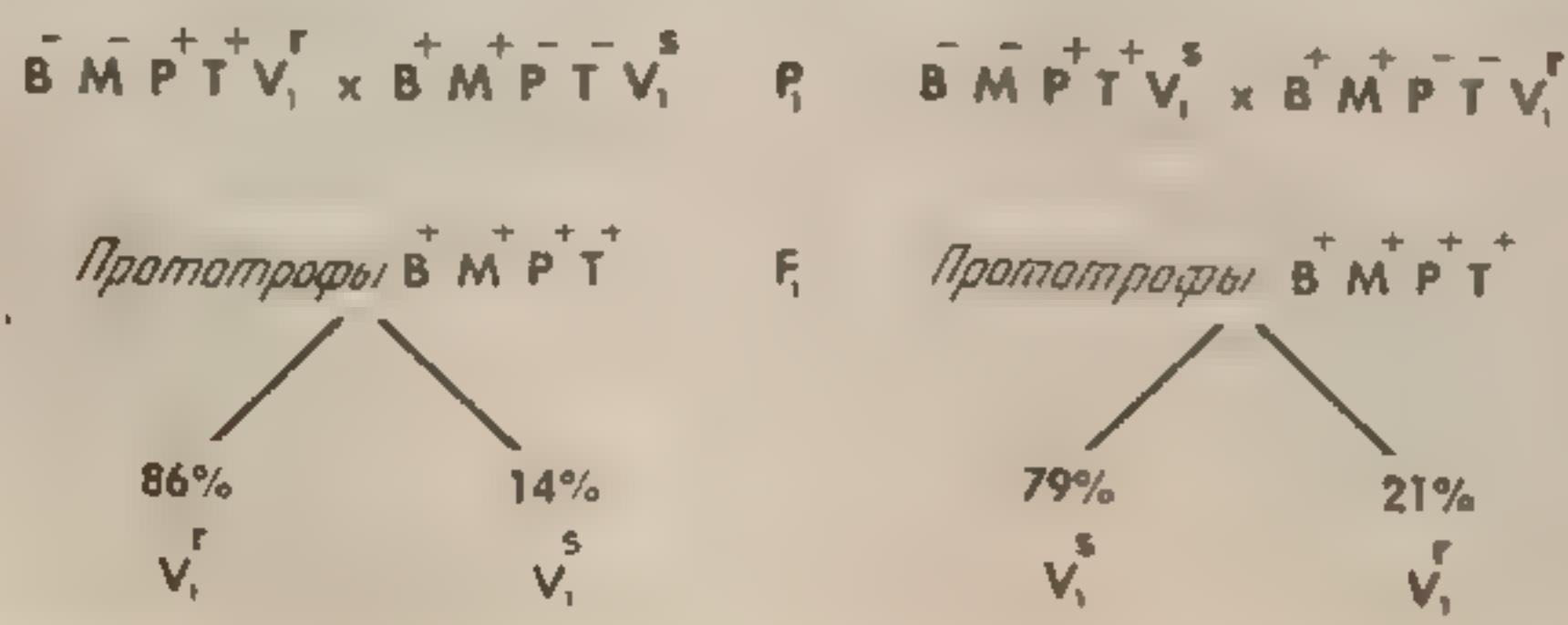


РИС. 23-6.

Генетические рекомбинации, получаемые в реципрокных скрещиваниях, включающих неселективируемые маркеры



ДЖОШУА ЛЕДЕРБЕРГ и ЭСТЕР МЕРИЛИН ЛЕДЕРБЕРГ
(1951 г.)

ционными (при сегрегации или интеграции) расстояниям. Этот анализ доказывает, что *E. coli* вероятно имеет одну «хромосому».

Известно, что генетическая рекомбинация, осуществляемая посредством полового процесса (конъюгации), встречается среди бактерий не только у *Escherichia*, но и у *Pseudomonas*, а при особых условиях и у *Serratia* и *Salmonella*. В организме млекопитающего наблюдали межродовую конъюгацию между *Escherichia* и *Salmonella*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клоны бактерий представляют собой замечательный экспериментальный материал для изучения мутационного процесса и определения его частоты. Описаны методы выделения и определения мутантов. Мутанты возникают спонтанно, независимо от факторов, по отношению к которым они могут быть адаптивными.

У *Escherichia coli* и других бактерий генетическая рекомбинация происходит после полового процесса (конъюгации). Нормально *E. coli* содержит гаплоидную ядерную зону, в которой все изученные гены принадлежат к одной линейной группе сцепления.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

23.1. Представлены ли в предыдущих главах какие-либо доказательства преадаптивной природы спонтанных мутаций и если представлены, то где?

23.2. Допустим, что в тысячу пробирок, не содержащих стрептомицина, посеяно по одной бактериальной клетке из чувствительного к стрептомицину клона. Пробирки инкубируются до тех пор, пока в каждой из них не будет около миллиарда бактерий. Какого рода результаты можно получить при рассеивании содержимого каждой пробирки на агар, содержа-

щий стрептомицин, если допустить, что мутации к стрептомициноустойчивости постадаптивны? В случае преадаптивного происхождения мутаций? Можно ли сделать выбор между этими двумя возможностями на основании ожидаемых результатов? Каким образом?

23.3. Правильно ли заключить на основании приведенных здесь данных об устойчивых мутантах, что применявшиеся препараты не обладают мутагенным действием? Объясните.

23.4. Критически рассмотрите попытку доказать наличие генетической рекомбинации при конъюгации экспериментом, в котором смешиваются два бактериальных штамма, единично ауксотрофных в отношении различных факторов, и потом проверяется присутствие прототрофов в расewe.

23.5. Почему тщетны попытки получить цитологические доказательства процесса конъюгации у бактерий?

23.6. Укажите различия между селектируемыми и неселектируемыми маркерами и приведите пример. В чем отличие единичного ауксотрофа от прототрофа?

23.7. Каким образом в этой главе доказывается тот факт, что два ауксотрофа, образуя прототрофное потомство, образуют его в результате конъюгации, а не в результате мутации, генетической трансформации или вирусной инфекции?

23.8. Чем отличается генетическая трансформация от конъюгации?

23.9. Придумайте соответствующие генотипы для родителей, зиготы и ее клонального потомства и докажете существование зиготы, исходя из генотипов особей клона, который она образует.

23.10. Не принимая во внимание центромеру, нарисуйте все возможные варианты хромосомы с линейной рекомбинационной картой.

23.11. Полагаете ли Вы, что открытие полового процесса у бактерий имеет большое значение для практической медицины? Почему?

ЛИТЕРАТУРА

- J. Lederberg. Gene Recombination and Linked Segregation in *Escherichia coli*. — Genetics, 1947, 32, 505. Reprinted in «Paper on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 247.
- J. Lederberg. Bacterial Reproduction. — Harvey Lect., 1959, 53, 69.
- J. Lederberg, E. M. Lederberg. Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. — J. Bacteriol., 1952, 63, 399. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 24.
- J. Lederberg, E. L. Tatum. Gene Recombination in *Escherichia coli*. — Nature, 1946, 158, 558. Reprinted in «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). N. J., Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1959, p. 192.

Равноц
этой па
из одно
чувстви
вать др
были об
то клет
в конце
предвар
из двух
Однако
удалось
вательно
дающая
цином —
зиготу. I
чить ре
должна
и гибель
влияет на
ская клет
звание F⁺
действую
ние F⁻-к
и женски
генетическ
В эксп
ного штам
Вариан
ауксотроф
(образуют
бинанты не
так как кл
F⁺-клетки
чески как
клетки пом
щаются в F
за такое п
вдвое превь
вдвое быстр
мужских кле
Известны
1. F-фактор
также и не м
способност
вирусом). 2.
щивания, со

Равноценны ли две конъюгирующие бактерии? Способна ли каждая из этой пары вести себя и как донор, и как реципиент при передаче ДНК из одной клетки в другую? Рассмотрим случай, когда две стрептомициночувствительные и ауксотрофно различные линии способны конъюгировать друг с другом, образуя рекомбинантное потомство. Если обе линии были обработаны стрептомицином перед тем, как их смешали и рассеяли, то клетки обеих линий оказываются неспособными делиться. Все клетки в конце концов погибают и рекомбинантные клоны не образуются. Если предварительно воздействовали стрептомицином только на клетки одной из двух родительских линий, то рекомбинанты тоже не образовывались. Однако после предварительной обработки другой родительской линии удалось получить прототрофные рекомбинанты (W. Hayes, 1953). Следовательно, родительские линии не равноценны: родительская клетка, не дающая рекомбинантов в случае предварительной обработки стрептомицином — это ДНК-принимаящая клетка, образующая после конъюгации зиготу. Если эта родительская клетка убита стрептомицином, то получить рекомбинантные клоны невозможно. Другая родительская линия должна всегда служить донором, передающим ДНК при конъюгации, и гибель ее клеток после того, как они сыграли свою роль донора, не влияет на образование зиготы и последующую рекомбинацию. Родительская клетка, действующая в качестве генетического донора, получила название F^+ -клетки (Fertilization — оплодотворение); родительская клетка, действующая в качестве генетического реципиента, получила название F^- -клетки. Эти типы клеток соответственно осуществляют мужские и женские функции. Таким образом, в случае конъюгации бактерий генетическая передача идет лишь в одном направлении.

В эксперименте, обсуждавшемся на стр. 325—326, в качестве исходного штамма использовали *E. coli* K 12 F^+ .

Вариант F^- , вероятно, возник в процессе получения одной из тройных ауксотрофных линий. Скрещивание $F^+ \times F^-$ оказывается плодовитым (образуются рекомбинанты); скрещивание $F^- \times F^+$ — стерильно (рекомбинанты не образуются). Скрещивание $F^+ \times F^-$ может быть плодовитым, так как клетки F^+ способны иногда спонтанно изменяться в F^- или же F^+ -клетки (действующие как F^- -фенокопии), иногда ведут себя фенотипически как F^- , хотя генетически они представляют собой F^+ . Если F^- -клетки поместить в культуру F^- -клеток, то все F^- -клетки быстро превращаются в F^+ . Скорость изменения F^- в F^+ показывает, что ответственный за такое превращение фактор F^+ должен размножаться со скоростью, вдвое превышающей скорость деления обычной клетки (и, следовательно, вдвое быстрее хромосомной ДНК). Следовательно, у *E. coli* плодовитость мужских клеток F^+ обусловлена инфекционным фактором (или частицей) F .

Известны некоторые свойства фактора F .

1. F -фактор передается от мужских клеток к женским только при контакте и не может быть выделен в виде свободной частицы, сохраняющей способность менять пол клеток (поэтому его нельзя считать типичным вирусом). 2. При скрещивании передается только одна частица F . 3. Скрещивания, сопровождающиеся передачей фактора F , встречаются чаще,

но менее стабильны, чем скрещивания, сопровождающиеся передачей хромосомы. Кратковременная конъюгация, ведущая к передаче фактора F, не сопровождается передачей каких-либо известных хромосомных маркеров. 4. Обработка особей F⁺ красителем акридиновым оранжевым приводит к подавлению репликации фактора F, в результате чего в потомстве появляются клетки F⁻. Акридиновые красители подавляют также синтез хромосомной ДНК, однако не столь полно, как они подавляют репликацию фактора F. Следовательно, чувствительность к «излечению» акридинами — это действительно отличительное свойство фактора F. В стабильных F⁺-культурах размножение F-фактора протекает точно с такой же скоростью, как дупликация хромосом. Это свидетельствует о точной регуляции числа F-частиц, которое приходится на одну хромосому; если же такая регуляция оказывается неэффективной (например, при превращении популяции F⁻ в F⁺ немногими F⁺-клетками), наблюдается чрезвычайно быстрое размножение фактора F.

Этих данных вполне достаточно для того, чтобы заключить, что F-фактор — *внехромосомная* частица. F-фактор не только делает клетку потенциально плодовитой мужской клеткой (т. е. потенциально способной действовать в качестве хромосомного донора), но влияет также на содержащую его клетку и в других отношениях:

1. F-фактор изменяет поверхность мужской клетки таким образом, что она способна узнавать женскую клетку при контакте с нею и взаимодействовать с этой клеткой.

2. F-фактор способствует образованию мостика между мужской и женской клетками, по которому он сам или хромосома проникают в F⁻-клетку.

3. F-фактор, по-видимому, также способствует образованию на поверхности клетки неких рецепторов для вирусов, повреждающих только мужские клетки (T. Loeb, N. Zinder, 1961).

4. Наконец, F-фактор способствует передаче с низкой частотой случайных хромосомных маркеров во время скрещивания F⁺ × F⁻. Это явление получило название *Lfr* («низкая частота рекомбинации» от английского Low frequency of recombination). До сих пор мы говорили о двух типах *E. coli* по отношению к скрещиванию F⁻ и F⁺. Еще один тип может возникнуть из F⁺-клеток. Он отличается тем, что дает довольно высокую частоту рекомбинации хромосомных генов (по-английски — High frequency of recombination) и поэтому назван *Hfr*. На плодовитость *Hfr*-клеток предварительная обработка стрептомицином не оказывает влияния; поэтому клетки *Hfr* следует считать донорами. Такие *Hfr*-клетки могут спариваться с F⁻ и F⁺-клетками (с теми F⁺, которые либо спонтанно изменились в F⁻, либо ведут себя как F⁻-фенокопии), хотя в последнем случае плодовитость низкая. Скрещивания *Hfr* с F⁻-клетками дают в 100—20 000 раз больше рекомбинантов, чем скрещивания F⁺ × F⁻. Клетки *Hfr* обычно не несут инфекционных F-частиц, так как потомство от скрещивания *Hfr* × F⁻ представлено обычно F⁻-клетками и лишь изредка *Hfr*-клетками. Однако *Hfr*-штаммы могут ревертировать, т. е. возвращаться к исходному состоянию F⁺, обнаруживая при этом все свойства F⁺-штаммов, в том числе наличие инфекционного F-фактора. *Hfr*-штаммы могут происходить только от F⁺-штаммов и ревертируют только к F⁺-штаммам; отсюда можно заключить, что F-фактор должен сохраняться в *Hfr*-штаммах в скрытой, или связанной, форме. F-фактор, существующий в такой скрытой форме, подавляет репликацию любого локализованного вне хромосомы F-фактора, способного инфицировать другие клетки.

Получение *Hfr*-штамма способствовало успеху цитологических поисков конъюгирующих пар бактерий.

На рис. 24—1 приведена электронномикроскопическая фотография,

показы
клетка
несет
цы бак
щие фо
ультра
ка F⁻
стиц,
устойч
виден
между
конъюг
ных H
изолиро
нипуля
рекомби
получен
тим, что
ка и ци
ствуют
наук.

При
Hfr × F⁻
шинство
ров в р
получено
результ
либо пер
только ч
ным вкл
бы сдела
коб пров

Опред
щивали о
быстрого
жутки вр
брали пр
га. Така
для разд
и не влия
гаться ре
типов, из

После
чившихся
сразу же
в отношен
бинантов
должаться
маркеров
делах этог
штамма H
гации, тог
зы) требует
и на реком
расстоянии
временем
ме *Hfr*.

показывающая конъюгацию между клетками F^- и Hfr . Клетка Hfr несет на своей поверхности частицы бактериального вируса (имеющие форму головастика), убитые ультрафиолетовыми лучами; клетка F^- не адсорбирует этих частиц, так как она генетически устойчива к этому вирусу. Ясно виден цитоплазматический мостик между конъюгантами. Если после конъюгации таких маркированных Hfr - и F^- -клеток последние изолировать с помощью микроманипулятора и культивировать, то рекомбинанты дают только клоны, полученные от F^- -партнера. Заметим, что и в этом случае генетика и цитология взаимно способствуют прогрессу каждой из этих наук.

При изучении скрещиваний $Hfr \times F^-$ обычно находят, что большинство неселектируемых маркеров в рекомбинантном потомстве получено от родителя F^- . Эти результаты могут быть объяснены

либо передачей всего генома мужской клетки в женскую с включением только части его, либо передачей только части мужского генома и полным включением ее, либо сочетанием обеих ситуаций. Для того чтобы сделать выбор между возможными объяснениями, Вольман и Жакоб провели следующие эксперименты.

Определенные генетически маркированные штаммы Hfr и F^- выращивали отдельно и затем смешивали в соотношении 1 : 20 для обеспечения быстрого контактирования всех Hfr с F^- -клетками. В разные промежутки времени, на протяжении примерно двух часов после смешивания, брали пробы и подвергали их сильному встряхиванию в смесителе Уоринга. Такая обработка представляет собой весьма эффективное средство для разделения бактерий, входящих в состав конъюгирующих пар, и не влияет на жизнеспособность бактерий, на их способность подвергаться рекомбинации и на выражение различных хромосомных генотипов, изучаемых в этих опытах.

После разделения бактерии рассеивали и проверяли на наличие включившихся мужских маркеров. Как и следовало ожидать, в пробе, взятой сразу же после смешивания (проба в нулевой момент), рекомбинантов в отношении мужских маркеров не обнаружено; для получения рекомбинантов по всем маркерам мужского штамма, конъюгация должна продолжаться примерно 107 минут. Однако время вхождения различных маркеров мужского штамма в женскую клетку широко варьирует в пределах этого интервала времени (табл. 24—1). Например, T - и L -маркеры штамма Hfr входят в F^- -клетку не ранее 8,5 минут после начала конъюгации, тогда как для вхождения маркера Gal (сбраживание галактозы) требуется около 25 минут. Известно, что T и L сцеплены друг с другом и на рекомбинационной карте F^+ (стр. 328) находятся на значительном расстоянии от Gal ; следовательно, существует определенная связь между временем передачи от Hfr к F^- и локализацией маркера на хромосоме Hfr .



РИС. 24-1.

Конъюгация у *E. coli* (фото Т. Anderson)

Таблица 24—1

РЕКОМБИНАНТЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ
ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ПРЕРЫВАНИИ КОНЪЮГАЦИИ
В РАЗЛИЧНЫЕ МОМЕНТЫ ВРЕМЕНИ
ПОСЛЕ СМЕШИВАНИЯ КУЛЬТУР F^- И Hfr . ШТАММ Hfr
НЕСЕТ МАРКЕРЫ T, L, Az, T_1, Lac, Gal
(ПО У. ХЭЙСУ)

| Минуты | Рекомбинанты, получившие от Hfr маркеры: |
|--------|--|
| 0 | Ни одного |
| 8 | T |
| 8,5 | T, L |
| 9 | T, L, Az |
| 11 | T, L, Az, T_1 |
| 18 | T, L, Az, T_1, Lac |
| 25 | T, L, Az, T_1, Lac, Gal |

Если бы различные участки хромосомы Hfr входили в F^- -клетку беспорядочно, то нельзя было бы получить подобных результатов. Следовательно, хромосома Hfr передается специфическим способом: один определенный конец нити ДНК обычно входит в F^- -клетку первым, так как локусы, которые передаются при этом, входят в клетку в строгой линейной последовательности (табл. 24—1). Другие эксперименты показывают, что для процесса передачи требуется энергия, а скорость вхождения одинакова от первого участка хромосомы, который передается первым и обозначен как O (от англ. origin — начало), вплоть до локуса Lac (сбраживание лактозы) и включая его.

Независимо от того, приобретают или теряют клетки сегмент искусственно разорванной хромосомы, выживают как мужские, так и женские клетки. Разрыв хромосом может также произойти спонтанно; из-за таких разрывов обычно передается только часть хромосомы Hfr .

Следовательно, реципиентная клетка получает фрагменты хромосомы различной длины. Такие фрагменты получили название *мерогенов*. Образующаяся в результате скрещивания с Hfr -штаммом зигота представляет собой образуемый в процессе частичного генетического обмена (*меромиксиса*) частичный диплоид (*мерозиготу*). Эти три новых термина применимы также и к трансформации.

Частота рекомбинации для всех хромосомных генов в F^+ -штамме довольно низка. В случае же Hfr -штамма частота рекомбинации высока для маркеров, наиболее близко расположенных к точке O , хотя с увеличением расстояния между маркерами и точкой O она уменьшается и для наиболее удаленных от O маркеров составляет только 10^{-5} — 10^{-4} . Ранее уже указывалось, что в потомстве от скрещивания $Hfr \times F^-$ лишь изредка можно обнаружить Hfr -линии. Линии Hfr возникают только в тех случаях, когда передается наиболее удаленный от O терминальный маркер. Следовательно, локус, ответственный за признак Hfr , локализован в хромосоме. Более того, поскольку не удается обнаружить какого-либо хромосомного локуса, который передавался бы после локуса Hfr , можно заключить, что Hfr всегда локализуется в конце передаваемой хромосомы.

Некоторые Hfr -штаммы, полученные из культур F^- , способны давать рекомбинации с очень высокой частотой (А. Taylor, E. Adelberg, 1960). У этих штаммов частота рекомбинации в отношении наиболее удаленных от точки O маркеров достигает 1—2%. Такая частота по крайней мере в сто раз превышает определенную для других Hfr -штаммов частоту рекомбинации в отношении тех же маркеров. Даже в этом случае среди потомства, полученного от скрещивания Hfr с F^- , менее 1% рекомби-

нантов относятся к *Hfr*. Эксперименты с искусственным прерыванием конъюгации позволяют установить последовательность определенных маркированных генов для каждого из трех независимо возникших штаммов *Hfr* этого типа.

Такие последовательности представлены на рис. 24—2, где приводится также частота возникновения рекомбинантов на сто клеток *Hfr* в смеси способных конъюгировать клеток. Последовательность расположения маркеров в трех различных штаммах *Hfr* одинакова. Однако в каждом случае точка О находится в разных положениях. Соответственно меняется положение *Hfr*-локуса, находящегося в конце группы сцепления. Эти результаты позволили Жакобу и Вольману высказать следующие предположения:

1) группа сцепления у *E. coli* обычно кольцевая;

2) фактор, обуславливающий признак *Hfr*, способен локализоваться в различных участках хромосомы в результате генетического события, ведущего к образованию *Hfr* штаммов;

3) во время передачи хромосомы группа сцепления размыкается в точке, примыкающей к месту прикрепления *Hfr*, в результате чего locus *Hfr* оказывается на конце, противоположном точке О.

Исследования других штаммов *Hfr* (А. Taylor, Е. Adelberg, 1961) подтвердили правильность всех этих предположений, в том числе гипотезу о различных местоположениях *Hfr*, которые, таким образом, определяют различные О точки и различные последовательности вхождения маркеров.

Если синтез ДНК происходит в присутствии радиоактивного тимидина, то радиоавтографическое изучение реплицирующейся ДНК обнаруживает присутствие у *E. coli* одной кольцевой двуспиральной хромосомы. Одна хромосома либо представляет собой одну молекулу ДНК, либо она составлена из серии молекул ДНК, соединенных концами с помощью связей, не свойственных нуклеиновым кислотам. Нет определенных данных, которые позволили бы остановиться на одной из этих двух возможностей. Было, однако, показано, что хромосома имеет тенденцию к фрагментированию в определенных точках во время размножения некоторых бактериальных вирусов в инфицированных клетках. Если хромосома действительно состоит из ряда молекул ДНК и ее разрыв действительно происходит во всех участках, несущих только что упомянутые связи, то тогда молекулы ДНК должны иметь молекулярный вес, равный 10^7 , или содержать примерно 16 000 нуклеотидных пар. Другие данные показывают, что группа сцепления штамма *Hfr* обычно кольцевая, но при конъюгации она разъединяется в локусе *Hfr*.

Мужской штамм *Hfr* начинает передачу всегда одним и тем же хромосомным маркером; по-видимому, *Hfr* вызывает разрыв кольцевой хромосомы только в одной из двух областей, непосредственно прилегающих к нему. Последовательность вхождения маркеров различна для различных штаммов (хромосома АВ-312 передает маркеры в последовательности,

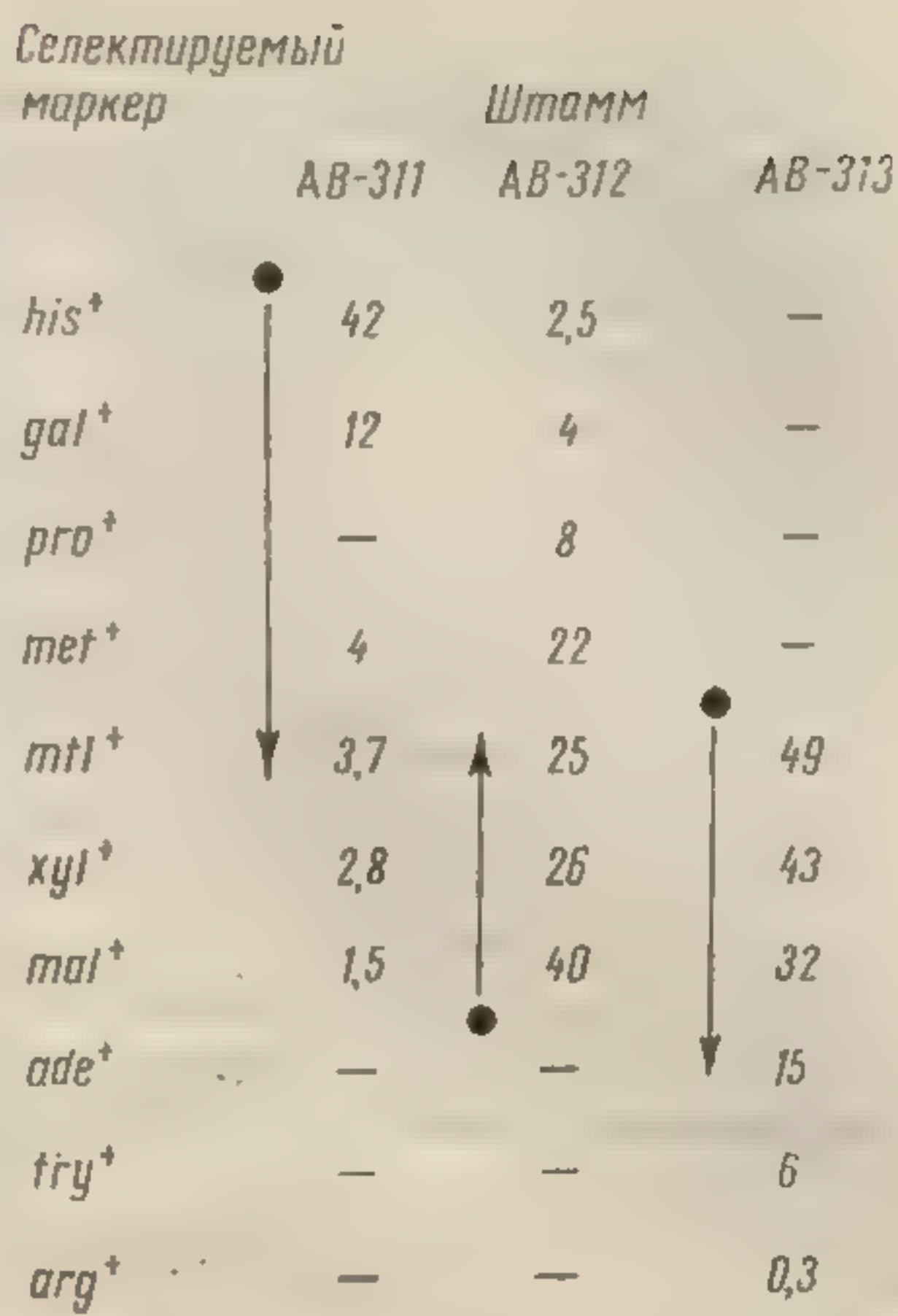


РИС. 24-2.

Количество рекомбинантов (в %) при использовании различных штаммов *Hfr*

Кружок — точка начала; тире — не изучено (А. Taylor, Е. Adelberg, 1960)

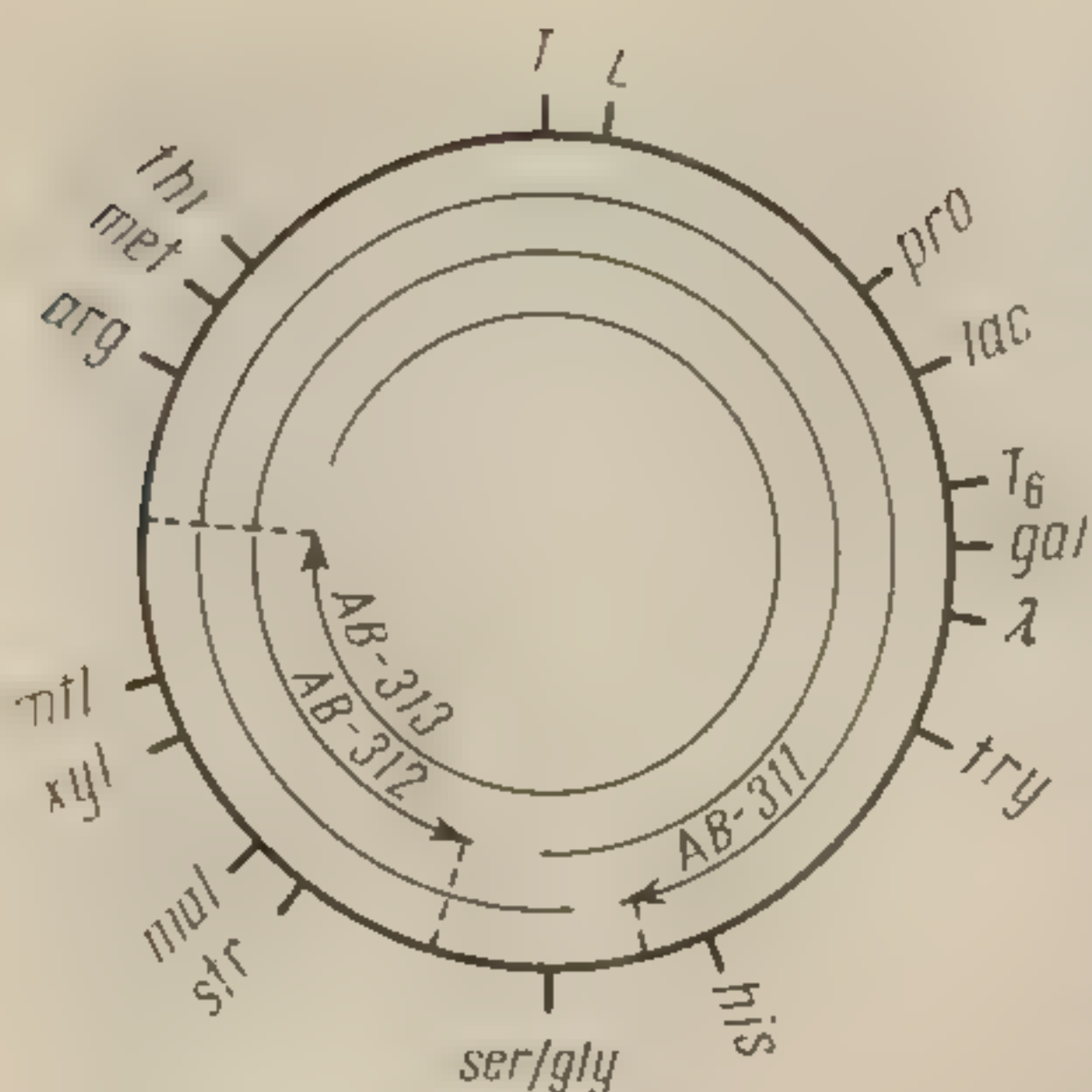


Рис. 24-3.

Линейные хромосомы трех штаммов *Hfr*

Стрелки — направление переноса хромосомы при конъюгации (A. Taylor и E. Adelberg, 1960)

соединиться в клетке реципиента, после того как конъюгация закончилась? Если считать синапсис одним из необходимых условий для рекомбинации, то этот вопрос касается только тех реципиентов, которые получили полную хромосому донора. В этом случае ответ должен быть положительным, так как сцепление локуса *Hfr* с точкой *O* в таких клетках восстанавливается, т. е. концы действительно соединяются и происходит это довольно быстро.

Частота рекомбинации, наблюдаемой после конъюгации, зависит как от частоты вхождения маркера, так и от эффективности его интеграции. В экспериментах с прерыванием конъюгации удается установить последовательность маркеров независимо от частоты, с которой происходит их включение (если эта частота больше нуля). Зная последовательность вхождения маркеров, можно изучить эффективность интеграции. Так, если скрещивание продолжается достаточно долго для того, чтобы почти во все клетки F^- успел проникнуть проверяемый маркер, то процент зигот, образующих рекомбинанты в отношении этого маркера, будет указывать эффективность интеграции. Если в 50% реципиентных клеток произошла интеграция передаваемого маркера, то эффективность интеграции этого локуса равна 0,5. Можно также проверить, являются ли рекомбинанты по данному локусу рекомбинантами в отношении маркеров, переданных ранее. С помощью этих и других методов можно определить эффективность интеграции различных маркеров после вхождения их в клетку. В среднем для каждого маркера эффективность интеграции равна приблизительно 0,5. Существуют различия в проникновении различных маркеров в клетку реципиента: чем ближе ген расположен к точке *O*, тем больше вероятность его интеграции в хромосоме. Напомним, что разрыв одной из нитей двойной спирали ДНК донора, вызываемый ДНКазой, не влияет на включение ДНК донора в ДНК реципиента, однако частота трансформации вследствие такого разрыва резко падает. Теоретически возможно, что уменьшение общей вероятности интеграции с увеличением расстояния от точки *O* иногда связано с разрывом одной нити двойной спирали ДНК, в то время как другая нить остается неизменной. В этом случае повреждения остова ДНК влияют не только на хромосомные поломки (путем продоль-

обратной последовательности вхождения маркеров штаммов АВ-311 или АВ-313; см. рис. 24—3 и 24—4). Это может быть обусловлено инверсией *Hfr*, в результате которой он локализуется в другом хромосомном участке.

Известно, что кольцевая хромосома *E. coli* размыкается при передаче *Hfr*. В связи с этим возникает вопрос, способны ли два новых конца снова соединиться. Следует четко представить себе, что переходит в клетку реципиента и что остается в клетке донора. До сих пор существует очень немного данных о том, какая часть хромосомы остается в клетке донора после конъюгации. Следовательно, пока невозможно ответить на вопрос, способны ли концы остатка снова соединиться. Ясно, что хромосома донора в процессе конъюгации остается линейной и открытой. Однако способны ли два конца этой хромосомы или фрагмента хромосомы

ного ра
разрыва
Скор
половин
ее поло
нуклеоти
следоват
нуклеоти
температ
и в эффе
нием ко
генетичес
которыми
Ранее
мам даже
даются. И
передачи
примерно
раньше, ч
из дополн
внехромос
Как у
Ранее гово
следовател
диновым
патентная
Это предп
не инфекц
клеткам F^-
Hfr. Следо
в хромосом
известный
поэтому хр
хромосомно
ликация лю
отвращаетс
Что про
хромосомны
рекомбинац
 F^- -клеткой
ее в *Hfr*-хро
щим образ
сева их на п
ков, в котор
на исходной
встречаются
стью в тех у
с рекомбина
женные *Hfr*-
маркеров, ко
на отпеча
что для пере
превратится
рекомбинанто
начало *Hfr*-ш
Однако не
в результате с

ного разделения двойной цепи ДНК), но также на интеграцию (путем разрыва на каком-либо определенном уровне только одной из двух нитей).

Скорость вхождения ДНК донора примерно постоянна для первой половины хромосомы, однако она замедляется при вхождении второй ее половины. Бактериальная хромосома содержит примерно 10^7 пар нуклеотидов, а вся хромосома передается примерно в течение 2 час.; следовательно, в одну минуту при 37°C передается примерно 10^5 пар нуклеотидов (около 34 мк). Скорость передачи замедляется при снижении температуры. Принимая во внимание колебания в скорости вхождения и в эффективности интеграции, на основании экспериментов с прерыванием конъюгации при использовании штаммов *Hfr* можно построить генетическую карту маркеров *E. coli*, относительные расстояния между которыми выражены в минутах. Такая карта приводится на рис. 24—4.

Ранее указывалось, что фактор F передается от F^+ -штаммов к F^- -штаммам даже в тех случаях, когда известные хромосомные маркеры не передаются. В скрещиваниях с прерыванием конъюгации определяли время передачи F-частицы от F^+ -штамма. Показано, что F-фактор передается примерно через 5 мин. после смешивания F^+ и F^- , несколькими минутами раньше, чем передается какой-либо из хромосомных маркеров. Это одно из дополнительных доказательств того, что F-фактор представляет собой внехромосомный фактор.

Как уже упоминалось, штаммы *Hfr* всегда образуются из F^+ -штаммов. Ранее говорилось также, что штаммы *Hfr* могут ревертировать к F^+ , что, следовательно, штамм *Hfr* несет латентную F-частицу. Обработка акридиновым оранжевым не влияет на плодовитость *Hfr*; следовательно, латентная F-частица, по-видимому, не локализуется внехромосомно. Это предположение подтверждается тем фактом, что плодовитость *Hfr* не инфекционна; иными словами, фактор плодовитости не передается клеткам F^- после кратковременного спаривания их с мужскими клетками *Hfr*. Следовательно, латентная F-частица в *Hfr* должна локализоваться в хромосоме. Фактор F представляет собой по существу единственный известный фактор, необходимый для того, чтобы клетка была мужской: поэтому хромосомный локус, определяемый для *Hfr*, должен быть локусом хромосомного F-фактора. После включения фактора F в хромосому репликация любых остающихся цитоплазматических F-частиц обычно предотвращается или подавляется.

Что происходит в тех немногих клетках F^+ -клона, которые передают хромосомный материал, определяя способность F^+ -клона в целом давать рекомбинации с низкой частотой? Допустим, что для передачи хромосомы F^+ -клеткой частица F должна прикрепиться к хромосоме, превращая ее в *Hfr*-хромосому. Эту гипотезу Жакоб и Вольман проверили следующим образом. После смешивания маркированных штаммов F^+ и F^- и расщепления их на полноценную среду делали отпечатки для определения участков, в которых образуются рекомбинанты. Затем среди клеток, растущих на исходной чашке, пытались найти *Hfr*-штаммы. Новые *Hfr*-штаммы встречаются редко; однако их можно обнаружить с большей вероятностью в тех участках исходной чашки, которые соответствуют участкам с рекомбинантами на чашках, несущих отпечатки. Кроме того, обнаруженные *Hfr*-штаммы часто дают высокую частоту рекомбинации тех же маркеров, которые дают рекомбинацию в соответствующих участках на отпечатках. Другими словами, представляется разумным считать, что для передачи хромосомного материала клетка F^+ должна сначала превратиться в *Hfr*-клетку. Именно *Hfr* определяет возникновение рекомбинантов на отпечатках; особи его клона на исходной чашке дают начало *Hfr*-штаммам того же типа.

Однако не все рекомбинанты в скрещиваниях $F^+ \times F^-$ возникают в результате образования устойчивых *Hfr*-клеток. Например, воздействие

| | |
|---------------|--|
| gua | гуанин |
| H | H-антиген |
| his | гистидин |
| ilc | изолейцин |
| ilcA | изолейцин + валин |
| ilcB | изолейцин + валин |
| ilcC | изолейцин + валин |
| ind | индол |
| λ | профаг |
| lacY | лактоза |
| lacZ | лактоза |
| lacO | лактоза |
| leu | лейцин |
| lon | удлиненные формы |
| lys | лизин |
| lys+met | лизин + метионин |
| λ rec, malA | рецептор и мальтоза |
| malB | мальтоза |
| metA | метионин |
| metB | метионин |
| metF | метионин |
| metE | метионин или кобаламин |
| mtl | маннитол |
| muc | слизистость |
| O | O-антиген |
| pan | пантотеновая кислота |
| pheA, B | фенилаланин |
| pho | фосфатаза |
| pil | жгутиковость |
| proA | пролин |
| proB | пролин |
| proC | пролин |
| purA | пури |
| purB | пури |
| purC, E | пури |
| purD | пури |
| pyrA | урацил аргинин |
| pyrB | урацил |
| pyrC | урацил |
| pyrD | урацил |
| pyrE | урацил |
| pyrF | урацил |
| Rarg | репрессор |
| Rarg | репрессор |
| Ripho, Rrho 2 | репрессор |
| Rtry | репрессор |
| RC | РНК контроль |
| rha | рамноза |
| serA | серин |
| serB | серин |
| str | стрептомицин |
| tuc | янтарная кислота |
| T1, T5 rec | рецепторный участок фага |
| T1 rec | рецепторный участок фага |
| T6, col | Krec рецепторный участок фага и колицина |
| T4 rec | рецепторный участок фага |
| thi | тиамин |
| thr | треонин |
| thy | тимин |
| tryA | триптофан |
| tryB | триптофан |
| tryC | триптофан |
| tryE | триптофан |
| tryD | триптофан |
| tyr | тирозин |
| uvtA | ультрафиолетовое облучение |
| xyl | ксилоза |

жгутиковый антиген
десять известных ферментов и оператор **
дезаминаза треонина
редуктоизомераза α-окси-β-кетокислоты **
α,β-дигидроксизовалерьяновая дегидраза
трансаминаза В
триптофаназа

галактозид-пермеаза
β-галактозидаза
мутации оператора
три известных фермента и оператор **
образование нитей и чувствительность к облучению
декарбоксилаза днаминопимелиновой кислоты
не установлена
пермеаза мальтозы и устойчивость к фагу
возможно амиломальтаза
синтез эфира янтарной кислоты и гомосерина **
эфир янтарной кислоты и гомосерина + цистеин в пистатионин **
вероятно 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза
не установлена
вероятно маннитолдегидрогеназа
регуляция синтеза полисахаридов оболочки
соматический антиген

щелочная фосфатаза

поддерживает синтропический рост мутантов
поддерживает синтропический рост мутантов
синтетаза аденил-янтарной кислоты
аденилсукциназа
5-аминоимидазолриботид (АИР) в 5-аминоимидазол 4-(N-сукцинокарбоксамид)риботид
биосинтез АИР
карбамат киназа
транскарбамилаза аспарагиновой кислоты
дигидрооротаза
дегидрогеназа дигидрооротовой кислоты
пирофосфорилаза оротидиловой кислоты
декарбоксилаза оротидиловой кислоты
репрессор аргинина
репрессор галактозы
репрессор щелочной фосфатазы
репрессор триптофана
регуляция синтеза РНК
использование D-рамнозы
3-фосфоглицерат дегидрогеназа
фосфосерин фосфатаза
устойчивость, чувствительность или зависимость от стрептомицина

устойчивость к фагам T1 и T5
устойчивость к фагу T1
устойчивость к фагу T6 и колицину K
устойчивость к фагу T4

тимидилатсинтетаза
триптофансинтетаза, белок А
триптофансинтетаза, белок В
индол-3-глицерофосфатсинтетаза
антракилован кислота в антракиловый дезоксирибулотид
3-енолпируватшкимат-5-фосфат в антракиловую кислоту

реактивация повреждений в ДНК, вызванных ультрафиолетовыми лучами
использование D-ксилозы

* Установившаяся система генетической номенклатуры по возможности сохранена, за исключением тех случаев, когда к функционально родственным генам произвольно приписаны заглавные буквы, начиная с буквы А, что не соответствует системе бактериальной генетической номенклатуры, предложенной Демерцем (1963).
** Ферменты, контролируемые гомологическими генетическими локусами у *Salmonella typhimurium*.

ультрафиолетовыми лучами в 30—50 раз повышает способность культуры F^+ давать хромосомные рекомбинанты, однако такое увеличение нельзя считать результатом устойчивого внедрения F-фактора в хромосому, поскольку его можно наблюдать только в течение одной-двух генераций. Более того, все попытки выделить устойчивый *Hfr* из других бактерий, несущих другие типы факторов плодovitости, оказались безуспешными. По-видимому, в F^+ -клетках, передающих хромосомные маркеры, возникает иногда (или постоянно) какой-то вид временного или несовершенного состояния *Hfr*.

Мужские клетки F^+ редко становятся *Hfr*; отсюда можно заключить, что внехромосомный F-фактор обладает слабым сродством по отношению к хромосоме. Клетки F^+ образуют *Hfr*-штаммы, имеющие различные точки O; отсюда можно заключить, что F не имеет определенного предпочтительного участка прикрепления. Фактор F состоит из ДНК (F, переданный культуре *Serratia*, образует дополнительную полосу ДНК в CsCl, не обнаруживаемую обычно у *Serratia*) и содержит примерно $2,5 \times 10^5$ пар оснований, или примерно 3,7% от количества, присутствующего в ядерной зоне. Несмотря на то, что для фактора F имеется значительное число участков на хромосоме, к которым он может прикрепиться, это число не бесконечно, о чем свидетельствуют повторные выделения штаммов с *Hfr*-локусом, картирующимся в одной и той же области. Во всяком случае, если исходить из того, что природно встречающийся F обладает областью, гомологичной определенным хромосомным участкам, а интеграция представляет собой рекомбинационное событие между F и хромосомой, то вполне возможно, что фактор F по своему размеру способен нести генетические области, гомологичные лишь небольшой доле хромосомных участков.

Репликация бактериальной хромосомы всегда протекает поляризованно, начинаясь в одной точке и продолжаясь по направлению к концу. Точка начала репликации у штаммов F^- определяется, по-видимому, случайно, однако ряд данных позволяет считать, что в *Hfr*-штаммах репликация начинается с F-содержащего конца хромосомы (Cairns, 1964; T. Nagata, 1964; N. Sueoka a. Yoshikawa, 1964). Для передачи хромосомы штаммами *Hfr*, возможно, необходимо, чтобы начался новый цикл репликации хромосомы (J. Roeser a. W. A. Konetzka, 1964). Мужской фактор плодovitости, фактор F, у *E. coli*, по-видимому, состоит из генетического материала. Об этом свидетельствуют результаты изучения химического состава этого фактора, существование его генетических альтернатив (E. Adelberg a. S. Burnes, 1960), а также его способность к автономному самоудвоению и факт гибели этого фактора вследствие «самоубийственного» включения P^{32} . Поскольку фактор F не является, по-видимому, ни литическим, ни каким-либо другим летальным фактором для F^- -клеток и устойчиво связан с F^+ -клеткой, то его следует считать «нормальным» клеточным компонентом. Благодаря своей способности функционировать и размножаться автономно в случае внехромосомной локализации, F-фактор остается пока единственным примером «нормального» внехромосомного генетического материала. Если внехромосомный фактор F утрачивается либо спонтанно, либо в результате обработки акридиновым оранжевым, то содержащийся в нем генетический материал не сохраняется для будущих генераций. F-фактор — генетический материал, и поэтому его передачу от F^+ - к F^- -клеткам следует рассматривать как случай генетической рекомбинации.

Фактор F способен занимать определенный локус в хромосоме. Будучи устойчиво прикрепленным или включенным в хромосому, он функционирует и репродуцируется точно так же, как любой другой обычный хромосомный ген. В ходе обычной вегетативной репродукции хромосомный F-фактор передается всему потомству и таким образом сохраняется.

Однако пр
так как ин
за исключе
мы. Но да
включиться
ничем не о

В предь
тических эл
сомы. К ни
либо имее
сутствует,
внехромосом
Также гены,
ных или «р
E. Wollman,

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

E. coli имеет
тов) — F^- и
и *Hfr*. Мужс
лизацией фа
Фактор F
мосомно. По
локализовать
гации мужск
вблизи locus
дается в клетк
всего разом
мы *Hfr* осущ

ВОПРОСЫ ДЛЯ

24.1. Как
новения ДНК
сегмента доно



Э. Л. ВОЛЬМАН (слева) и ФРАНСУА ЖАКОБ (справа)
(1961 г.)

Однако при конъюгации хромосомный F-фактор может и не сохраниться, так как интегрированный F не передается в зиготу с заметной частотой, за исключением тех случаев, когда используют определенные *Hfr*-штаммы. Но даже если F-фактор передается, он может оказаться неспособным включиться в геном. В таких случаях утрата F-фактора F⁻-клетками ничем не отличается от утраты других хромосомных локусов.

В предыдущих главах детально обсуждался единственный тип генетических элементов, существующих только в качестве элементов хромосомы. К ним можно теперь добавить мужской половой фактор F, который либо имеется, либо отсутствует в клетке; в тех случаях, когда он присутствует, этот фактор способен существовать либо как автономный внехромосомный фактор, либо как фактор, включенный в хромосому. Такие гены, которые могут присутствовать в клетке в виде внехромосомных или хромосомных элементов, получили название эписом (F. Jacob, E. Wollman, 1958).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

E. coli имеет только один тип женских клеток (генетических реципиентов) — F⁻ и два типа мужских клеток (генетических доноров) — F⁺ и *Hfr*. Мужской тип скрещиваемости определяется присутствием и локализацией фактора F.

Фактор F (эписома) инфекционен, если находится в клетке внехромосомно. Поэтому F⁺-клетки передают только F. Фактор F способен локализоваться в хромосоме, образуя мужской штамм *Hfr*. При конъюгации мужского штамма *Hfr* кольцевая хромосома *E. coli* размыкается вблизи локуса F. Конец хромосомы, противоположный F-локусу, передается в клетку реципиента первым при линейном переходе части, а иногда всего разомкнутого кольца хромосомы. Следовательно, мужские штаммы *Hfr* осуществляют передачу хромосомных локусов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

24.1. Какие события имеют место в женской клетке с момента проникновения ДНК донора до появления сегреганта, гаплоидного в отношении сегмента донорной ДНК?

24.2. Чем доказывается включение фактора F в хромосому? Доказывается ли это возможностью возвращения к прежнему состоянию (без включения фактора)?

24.3. Какими свойствами обладает F-фактор, включенный в хромосомный локус?

24.4. Влияют ли встречающиеся спонтанно разрывы хромосомы бактериального донора на результаты картирования линейного порядка генов с помощью искусственного прерывания скрещиваний? Объясните.

24.5. Допустим, что распад P^{32} , включенного в ДНК, протекая независимо от температуры, вызывает разрывы в хромосоме *E. coli*. Придумайте эксперимент для определения порядка генов в такой бактерии.

24.6. Как доказать, что ядерная зона *E. coli* обычно содержит одну хромосому? Как доказать, что эта хромосома кольцевая?

24.7. Укажите генотипы родителей и рекомбинантов и специфические культуральные условия, которые Вы использовали бы для отыскания линий *Hfr* среди потомства от скрещивания $F^+ \times F^-$.

24.8. Существует ли взаимосвязь между эписомами и генетической рекомбинацией?

24.9. Трансформирующая ДНК выделена из культур *Bacillus subtilis*, находящихся в стационарной (нерепликативной) фазе, и из экспоненциально растущих культур, находящихся в фазе асинхронной репродукции, и проверена в отношении 11 генетических маркеров. Какие можно ожидать количественные результаты, если репликация хромосомы осуществляется поляризованно?

ЛИТЕРАТУРА

- E. A. Adelberg, S. N. Burns. Genetic Variation in the Sex Factor of Escherichia coli.* — J. Bacteriol., 1960, 79, 321. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 353.
- J. Cairns. The Chromosome of Escherichia coli.* — Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1964, 28, 43.
- A. J. Clark, E. A. Adelberg. Bacterial Conjugation.* — Annual Rev. Microbiol., 16, Palo Alto, Calif. 1962, p. 289.
- W. Hayes. The Mechanism of Genetic Recombination in Escherichia coli.* — Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1953, 18, 75. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 268.
- W. Hayes. The Genetics of Bacteria and Their Viruses.* N. Y., 1964. (У. Хейс. Генетика бактерий и бактериофагов. М., изд-во «Мир», 1965).
- F. Jacob, E. L. Wollman. Episomes, Added Genetic Elements.* — Compt. rend. Acad. sci., 1958, 247, 154. Translated and reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 398.
- F. Jacob, E. L. Wollman. Genetic and Physical Determination of Chromosomal Segments in Escherichia coli.* — Sympos. Soc. Exptl. Biol., 1958, 12, 75. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 335.
- F. Jacob, E. L. Wollman. Sexuality and the Genetics of Bacteria.* N. Y., 1961. (Ф. Якоб, Э. Вольман. Пол и генетика бактерий. М., ИЛ, 1962).
- T. Nagata. The Sequential Replication of E. coli DNA.* — Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1964, 28, 55.
- J. Roeser, W. A. Konetzka. Chromosome Transfer and the DNA Replication Cycle in Escherichia coli.* — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1964, 16, 326.
- N. Sueoka, H. Yoshikawa. Regulation of Chromosome Replication in Bacillus subtilis.* — Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1964, 28, 47.
- A. L. Taylor, E. A. Adelberg. Linkage Analysis with Very High Frequency Males of Escherichia coli.* — Genetics, 1960, 45, 1233.
- A. L. Taylor, E. A. Adelberg. Evidence for a Closed Linkage Group in Hfr Males of Escherichia coli K-12.* — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1961, 5, 400.
- A. L. Taylor, M. S. Thoman. The Genetic Map of Escherichia coli K-2.* — Genetics, 1964, 50, 659.
- E. L. Wollman, F. Jacob, W. Hayes. Conjugation and Genetic Recombination in Escherichia coli K-12.* — Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1956, 21, 141. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 300.

¹ Фаги приня
² Последующе

ТРАНСДУКЦИЯ

Три предыдущие главы были посвящены проблеме рекомбинации генетического материала бактерий с помощью механизмов, обычно производящих перераспределение только части бактериального генома. При трансформации присутствие организма донора для вхождения его ДНК необязательно; при конъюгации же сегмент хромосомной ДНК переходит от бактерий донора к бактерии реципиента через цитоплазматический мостик, образование которого определяется присутствием частицы F. Сама частица F подвергается рекомбинации не только тогда, когда она инфекционна, но и при включении и высвобождении из бактериальной хромосомы.

Как уже указывалось ранее (стр. 324), предполагается, что гомологичный сегмент ДНК, независимо от способа введения его в бактериальную клетку, спаривается с бактериальной хромосомой и включается в нее. Существует третий возможный механизм введения гомологичной ДНК в бактериальные клетки. Бактериофаги, или фаги¹, представляют собой группу бактериальных вирусов. После прикрепления этих вирусов к поверхности бактериальной клетки (см. рис. 24—1) вся или часть фаговой частицы, остающейся вне бактериальной клетки, может быть удалена при встряхивании в микросмесителе. Такая обработка не влияет на процесс инфекции; иными словами, вирус еще способен характерным образом воздействовать на бактерию. Можно поэтому заключить, что часть вируса, существенная для этого воздействия, проникает в протоплазму бактериальной клетки, тогда как та часть фаговой частицы, которая остается прикрепленной к поверхности клетки, не влияет на последующее течение инфекции. Эти наблюдения позволили предположить существование другого способа проникновения гомологичной ДНК в инфицированную фагом клетку. Вирусная частица может нести сегмент ДНК, полученный от предыдущего бактериального хозяина. Этот кусок ДНК может проникнуть в клетку нового хозяина вместе с частью фага, причем проникновение фага обеспечивает проникновение бактериальной ДНК.

Имея все это в виду, рассмотрим серию экспериментов², сделанных на патогенных для мыши бактериях *Salmonella typhimurium*. Эту бактерию, подобно близкородственной ей *E. coli*, можно также культивировать на простой питательной среде. Получено большое число ауксотрофных штаммов *Salmonella*. В опытах были использованы два ауксотрофа, один из которых нуждается для роста в метионине (M^-T^-), а второй — в треонине (M^+T^-). При смешивании этих двух штаммов и последующем рассеве на культуральную среду, лишенную метионина и треонина, появляются прототрофные колонии, причем их количество так велико, что их возникновение не может быть объяснено мутационным процессом.

Прототрофы возникают также в том случае, когда жидкую культуру штамма M^+T^- центрифугируют (для осаждения большей части бактерий), супернатант прогревают в течение 20—30 мин. (чтобы убить оставшиеся

¹ Фаги принято обозначать греческой буквой ϕ .

² Последующее обсуждение основано на работе Н. Д. Циндера и Дж. Ледерберга (1952).

в нем бактериальные клетки) и эту жидкость добавляют к M^-T^+ -штамму. Такая процедура показывает, что для доставки M^+ -фактора, необходимого для образования прототрофа, не требуется присутствия живых клеток M^-T^- -донора. Совершенно очевидно, что в данном случае образование прототрофов идет не за счет конъюгации. Более того, фильтрат сохраняет полностью способность передавать M^+ после обработки ДНКазой. Следовательно, образование прототрофов происходит не в результате генетической рекомбинации при трансформации. M^+ -фактор способен проникать через фильтры, которые задерживают бактериальные клетки, но легко пропускают вирусы; следовательно, он относится к «фильтрующимся агентам». Обратный эксперимент, в котором использовали фильтраты M^-T^+ -штамма и клетки M^+T^- -штамма, не привел к возникновению рекомбинантов. Следовательно, эти два штамма различаются по способности быть донором.

Показано, что донорный штамм M^+T^- (но не штамм M^-T^+) содержит фаг. Этот фаг, обозначенный как Р22, относится к группе неvirulentных, или умеренных, вирусов. Тем не менее примерно одна на тысячу таких фаговых частиц размножается и лизирует, или взрывает, клетку хозяина с освобождением нескольких сотен частиц фагового потомства. Соответственно, культура бактерий, несущих умеренный фаг, не проявляет заметного лизиса. Так как каждая клетка M^+T^- -штамма, несущего Р22, потенциально способна подвергнуться лизису, такой штамм называют лизогенным. (Лизогенная бактерия, или лизоген, иммунна к новой инфекции, т. е. к суперинфекции идентичным, или гомологичным, фагом.) С другой стороны, штамм M^-T^- , который нормально не несет фага Р22, является нелизогенным, или чувствительным, штаммом. При обработке чувствительного штамма умеренным фагом относительно большая часть вновь инфицируемых клеток лизируется и освобождает фаг. Однако незначительная часть их способна выживать, становясь лизогенной и давая начало лизогенному потомству. Если лизогенные клетки искусственно лизировать и проверить на присутствие фага, то фаг не удастся обнаружить. Очевидно, фаг в лизогенных клетках превращается в новую форму, названную профагом. Профаг репродуцируется с той же скоростью, с какой репродуцируется хромосома хозяина. Для того, чтобы лизировать лизогенную клетку, профаг должен сначала быстро размножиться и образовать инфекционные фаговые частицы, освобождаемые во время лизиса.

Какая взаимосвязь существует между фильтрующимся M^+ -фактором и фагом Р22?

1. Они не повреждаются при действии РНКазой и ДНКазой.
2. При изменении температуры они инактивируются при одинаковой температуре.
3. Они одинаково чувствительны к антисыворотке, блокирующей способность фага прикрепляться к бактериальной клетке.
4. Оба фактора одновременно прикрепляются к чувствительным клеткам.
5. Оба фактора имеют одинаковые размеры и массу, о чем можно судить по результатам опытов с фильтрацией и осаждением.
6. Они появляются в среде в одно и то же время и в постоянном соотношении.
7. Постоянное соотношение фактора и фага сохраняется, даже если применяются различные способы очистки и концентрирования.

На основании этих результатов становится очевидным, что M^+ -фактор связан с фаговой частицей. Известно, что генетический материал сальмонелл представляет собой ДНК; поэтому вполне вероятно, что генетический фактор M^+ также состоит из ДНК. И еще один вывод: поскольку генетический фактор M^+ не может быть локализован на внешней поверх-

ности фаговой частицы, ген M^+ должен находиться внутри вирусной частицы.

Процесс генетической рекомбинации, осуществляющийся с помощью вирусной частицы, вводящей гомологичную ДНК в клетку реципиента, получил название *генетической трансдукции*.

Существуют ли какие-либо ограничения для генетического материала сальмонелл, который может быть трансдуцирован фагом P22? Вирус P22 может быть выращен на чувствительных бактериях, генетически маркированных $M^+T^+X^+Y^-Z^-$; часть полученного после такой инфекции фага используют для проверки на одном из чувствительных индикаторных штаммов (M^-, T^-, X^-, Y^-, Z^-). Результаты такой проверки показывают трансдукцию M^+, T^+ и X^+ , но не Y^+ или Z^+ . Другая часть фага используется для выращивания на другом генетически маркированном чувствительном штамме, например, $M^+, T^-X^+Y^+Z^-$. После получения урожая нового фага он проверяется на уже упомянутых индикаторных штаммах и оказывается, что в этом случае новый фаг утратил фактор T^+ , но приобрел способность трансдуцировать Y^+ . Эти результаты показывают, что фильтрат фага способен трансдуцировать маркеры, точно соответствующие тем, которые присутствуют у бактерий, на которых фаг выращивался в последний раз. Другими словами, фаг пассивен в отношении генов, которые он трансдуцирует, и не сохраняет трансдуцирующей способности от какого-либо хозяина, предшествовавшего последнему. Ряд дополнительных экспериментов показывает, что каждый локус сальмонелл может быть трансдуцирован фагом P22. Поэтому такой тип трансдукции получил название *неспецифической трансдукции*, или *общей трансдукции*. При общей трансдукции на каждые 10^6 инфицирующих частиц появляется одна клетка, трансдуцированная в отношении определенного маркера.

Фаг P22 способен трансдуцировать любой хромосомный маркер. Возможно ли трансдуцировать сразу более одного признака? Для получения ответа на этот вопрос фаг P22 можно вырастить на $M^+T^+X^-$ -хозяине и полученный лизат использовать для обработки бактерий $M^-T^-X^-$. Эти бактерии засевают и затем делают отпечатки выросших колоний на три различных среды — одну, селективирующую только M^+ -рекомбинанты (она содержит T и X), другую — только T^+ -рекомбинанты, и третью, селективирующую только X^+ . Если M^+ -клоны проверить в отношении других маркеров, все они еще остаются T^-X^- . Подобным же образом T^+ -клоны — все еще M^-X^- и X^+ -клоны — все еще M^-T^- . Эти результаты показывают, что только один бактериальный маркер, или относительно короткий сегмент ДНК, трансдуцируется за один раз. В этом отношении трансдукция подобна трансформации, но отличается от конъюгации, при которой может быть передан и включен (особенно при использовании *Hfr*-штаммов) большой ряд последовательно расположенных генов.

У сальмонелл, однако, известны случаи, когда вместе трансдуцируются несколько маркеров при так называемой *сцепленной трансдукции*, или *котрансдукции*. В другой работе показано, что биологический синтез аминокислоты триптофана представляет собой ряд последовательных генетически контролируемых реакций, протекающих от антралиновой кислоты через индол к триптофану. Разные гены, контролирующие разные ступени этого биосинтетического процесса, могут быть трансдуцированы совместно (M. Demerec и др.). Эти данные позволяют считать, что такие гены тесно сцеплены друг с другом. Известно, что в биосинтезе гистидина у сальмонелл участвуют, по крайней мере, восемь локусов, четыре из которых оказывают заметное влияние на последовательность включаемых химических реакций. Два или более из этих локусов могут быть совместно трансдуцированы. На основании сведений об относительных частотах различных

котрансдукций и других данных удалось показать, что все восемь локусов сцеплены друг с другом и расположены линейно (рис. 25—1). Используя котрансдукцию, можно построить полную и детальную генетическую карту сальмонелл, которая, как оказалось, представляет собой одно кольцо. Известно также, что котрансдукция тесно сцепленных маркеров встречается также у *E. coli* при использовании фага P1. (E. Lemoх).

В эксперименте с трансдукцией общего типа, когда прототроф получают в результате трансдукции ауксотрофа, новый прототроф является обычно устойчивым и образует клоны, фенотипически идентичные типичным прототрофам. Этот процесс получил название *полной трансдукции*. В этом случае введенный прототрофный ген должен включиться в хромосому реципиента вместо ауксотрофного аллеля. Однако наряду с крупными прототрофными колониями, образующимися на селективном агаре (каждый из этих клонов представляет результат полной трансдукции), иногда имеются мелкие колонии, которых примерно в 10 раз больше, чем крупных (рис. 25—2). Такие мелкие колонии не появляются в рассевах ауксотрофных мутантов на минимальной среде и, следовательно, не являются результатом взаимодействия между ауксотрофами и колониями нормальных или трансдуцированных прототрофов, находящихся на чашке. Образование мелких колоний объясняется следующим образом: в результате фаговой инфекции клетки, дающие начало мелким колониям, получают сегмент ДНК, содержащий ген прототрофности в отношении проверяемого признака. Такой ген не включается в хромосому и оказывается неспособным к репликации, сохраняя, однако, свою функциональную способность давать определенный фенотипический эффект. В результате образуется гибридная мерогенота, или *гетерогенота*, в которой введенный доминантный ген прототрофности является функционирующим. Поскольку образуется продукт прототрофного гена, клетка способна расти и делиться. Однако из первых двух дочерних клеток только одна получает дополнительный хромосомный фрагмент, *экзогеноту*. Дочерняя клетка без экзогеноты способна расти и делиться только до тех пор, пока запас продукта прототрофного гена, полученный от родительской клетки, не истощается; с другой стороны, дочерняя гетерогенотная клетка способна продолжать расти и делиться, образуя в свою очередь только одну гетерогенотную дочернюю клетку. Таким образом образуется мелкая колония, которая содержит одну генетически прототрофную клетку. Эти результаты были подтверждены в ряде случаев и разными способами (B. Stocker, J. Lederberg, N. Zinder, H. Ozeki, 1956). Такое последствие неудачной полной трансдукции получило название *абортивной трансдукции*.

Дальнейшую судьбу экзогеноты при абортивной трансдукции можно гипотетически представить двояко: либо экзогенота может быть, в конце концов, потеряна, либо она может быть включена в хромосому, т. е. в конечном счете произойдет полная трансдукция. Независимо от ее конечной судьбы, полагают, что экзогенота представляет собой генетический материал, хотя и не способный к саморепликации. Напомним, однако, что саморепликация — это свойство, характеризующее полный генетический материал, которое мы в исходных определениях гена не принимали во внимание (стр. 40).

В большинстве работ, посвященных изучению трансдукции, использовали избыток фага, т. е. каждую клетку инфицировали несколькими частицами фага. В таких экспериментах всегда обнаруживали, что трансдуцированные клетки становятся одновременно лизогенными. Следовательно, трансдуцируемая клетка получает не только экзогеноту, но также, по-видимому, полный геном фага, причем первая ведет к генетической рекомбинации в отношении одного или нескольких маркеров хозяина,

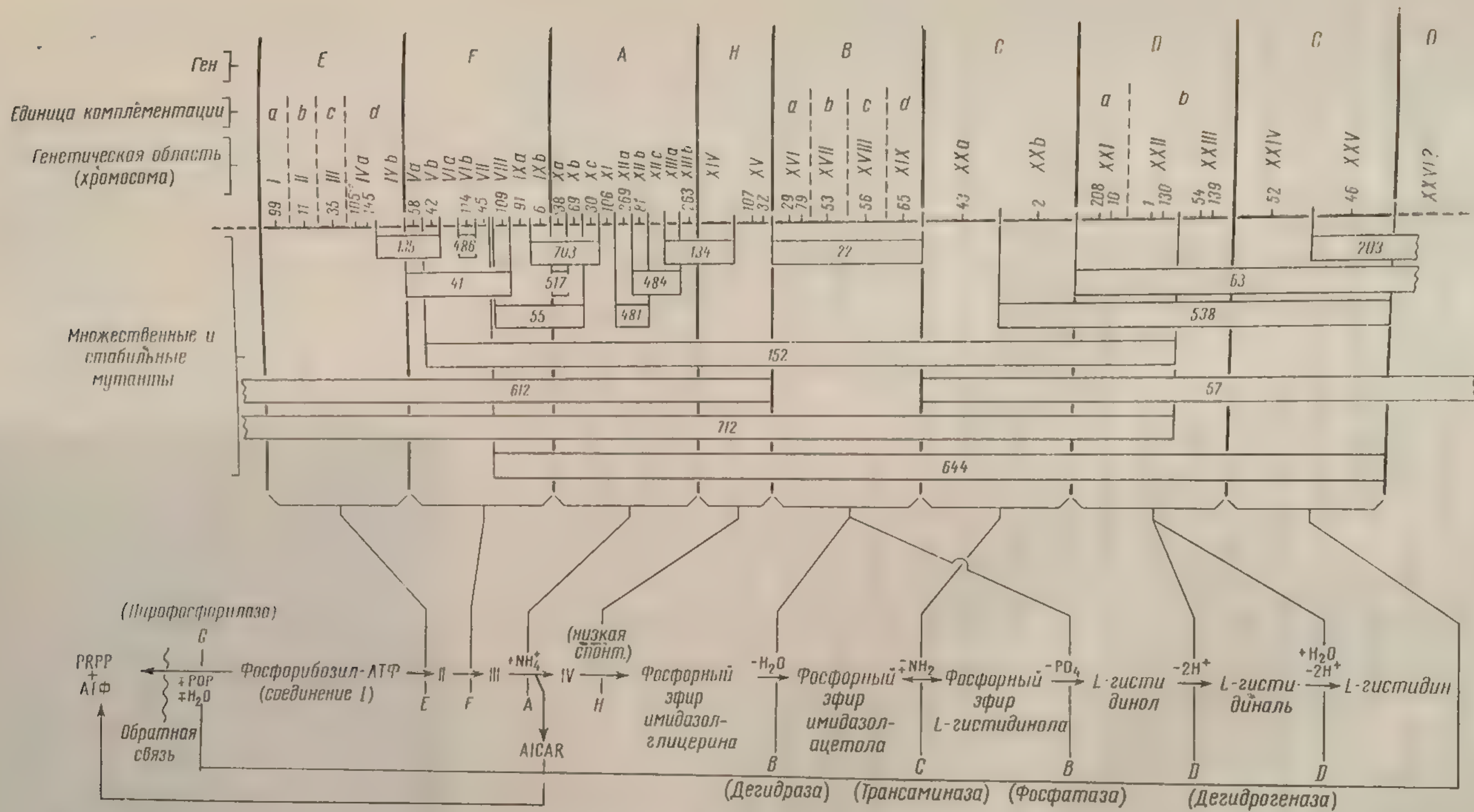


РИС. 25-1.

Гистидиновая область у сальмонелл (по Р. Hartman)

а последний — к установлению лизогении и иммунитета. Фаговая частица, которая делает клетку лизогенной, может быть совсем другой частицей, не имеющей отношения к той, которая вводит экзогеноту, так как используются высокие концентрации, т. е. множественность инфицирующих частиц, и в среднем в каждую клетку хозяина проникает две или более фаговых частиц. Следовательно, одна частица может доставлять экзогеноту, а другая — вызвать лизогению и иммунитет. Используя низкие концентрации фага для получения низких множественностей инфекций, в результате чего почти ни одна из бактерий не инфицируется более чем одной фаговой частицей, можно доказать, что по крайней мере в некоторых случаях для трансдукции необходима только одна фаговая частица. Более того, показано, что если чувствительная бактерия инфицирована одной частицей фага, то вирус способен обычно вызывать только один из трех взаимоисключающих эффектов: лизис, лизогению или трансдукцию (Г. Adams and S. Luria).

Штамм *E. coli* K12 нормально лизогенен в отношении умеренного фага лямбда (λ). Другой штамм *E. coli* не является лизогенным, т. е. проявляет чувствительность к лямбда. Этот фаг можно выделить в больших количествах из культуры лизогенных бактерий через несколько часов после воздействия ультрафиолетовых лучей. Такая *УФ-индукция* вызывает репликацию профага, и потомство фага лизирует клетку. В опытах с использованием λ -фага, выделенного из лизогенных культур, обнаружено, что этот фаг способен трансдуцировать только очень ограниченное число различных бактериальных маркеров. Они ограничены областью, контролирующей сбраживание галактозы, *локусом Gal*, маркеры которого, как известно из экспериментов с конъюгацией, очень тесно сцеплены. Следовательно, лямбда способен только к *специфической, или ограниченной, трансдукции*.

Как уже указывалось ранее, лизис лизогенной культуры, сопровождающийся освобождением инфекционного фага, может быть индуцирован ультрафиолетовыми лучами. При конъюгации лизогенного штамма *Hfr* с чувствительным F^- некоторые зиготы лизируются и освобождают инфекционный фаг. Этот способ индукции профага с образованием инфекционного фага и лизиса, наблюдаемый при конъюгации, получил название *зиготной индукции*. Зиготная индукция λ происходит с определенным штаммом *Hfr* в определенное время после начала конъюгации.

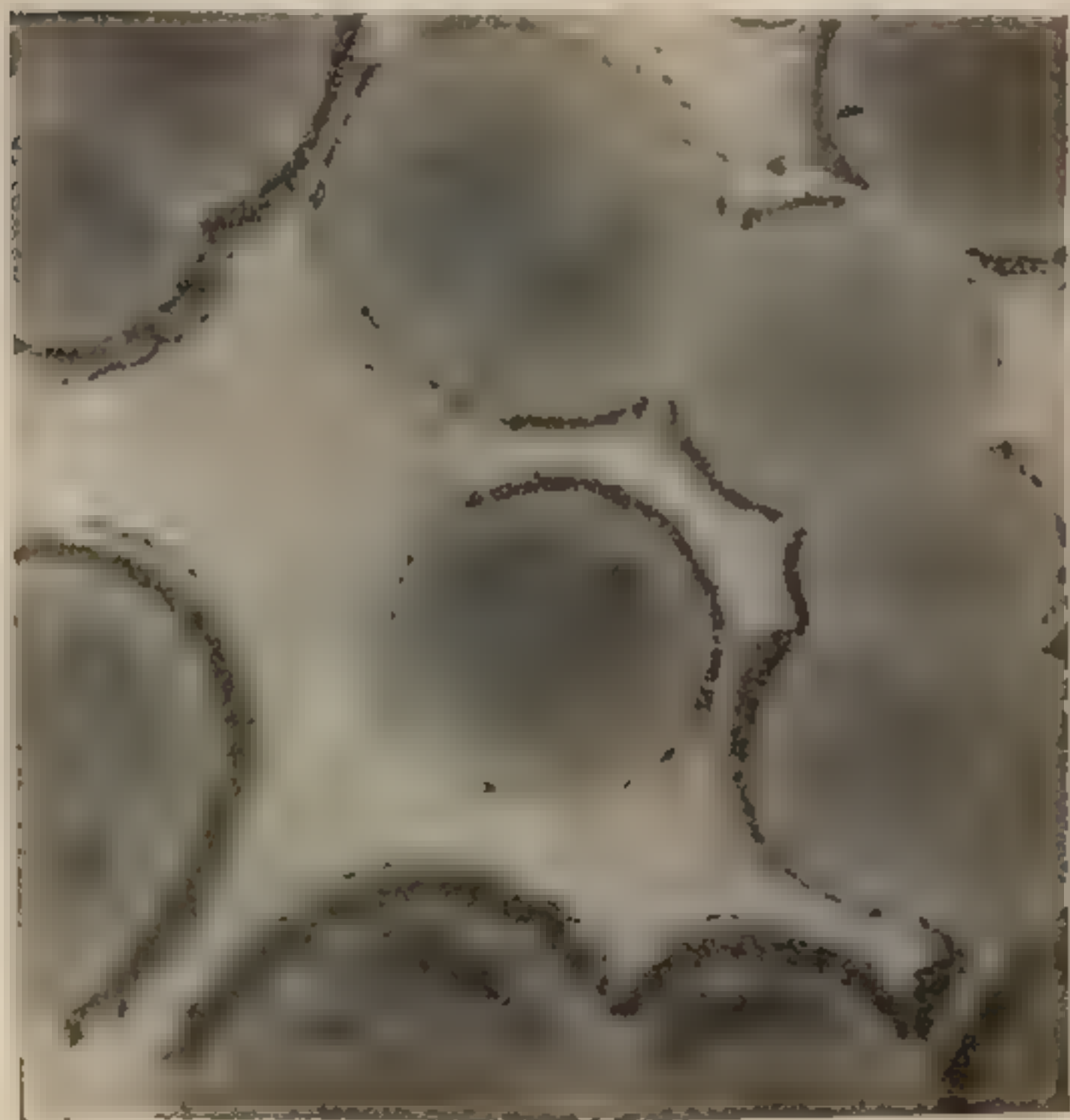


РИС. 25-2.

Крупные и мелкие (peri-
od-sized) колонии саль-
монелл, представляющие
собой полную и абор-
тивную трансдукции со-
ответственно (фото Р.
Hartman)

Это точно
деленный
зывается
крепляется
такого уч
зиготная
вует нел
штамм F^-
лизогенный
же, как л
татов пок
с локусом
на которо

Исход
и гаплоид
цу λ , нес
индукции
только ни
ction — н
цированн
Gal, т. е.
клетки. Д
том λ , нес
лоидную
ляет Gal^-
ции, отли
дукции с
не способе
мент спосо
зигот. Есл
хозяина,
зуется ли
Gal, чем в
богатый ф
дукции (Н

В случ
дуцирующ
инфициро
к огранич
способом
лизогенных
можно по
бактериал

Исполь
щих λ (выд
ленных вс
что трансд
(W. Arber
Gal при
 λ -генома,
Gal-трансд
няет одни
способность
фага; про
ным. Клет
не лизоген
может бы

Это точное время начала лизиса указывает, что в хромосоме есть определенный локус, с которым при установлении лизогении физически связывается профаг. В нелизогенных клетках профаг, который обычно прикрепляется или связывается с этим участком, отсутствует. При переносе такого участка с профагом в чувствительную F⁻-клетку происходит зиготная индукция. Однако в тех случаях, когда в скрещиваниях участвует нелизогенный штамм *Hfr* (не содержащий профага) и лизогенный штамм F⁻ (содержащий профаг), зиготная индукция отсутствует и нелизогенный локус передается и выщепляется в гетерогенотах точно так же, как любой другой генетический маркер. Эти и ряд других результатов показывают, что локус, занимаемый λ профагом, тесно сцеплен с локусом *Gal*, который фаг λ способен трансдуцировать (см. рис. 24—4, на котором локус прикрепления указан как λ).

Исходный лизогенный штамм K-12, несущий λ , является устойчивым и гаплоидным в отношении *Gal*-локуса и образует только одну часть λ , несущую *Gal*, на 10^4 — 10^7 частиц фага. Лизат, образуемый при индукции таких лизогенных в отношении λ культур, способен давать только низкую частоту трансдукции (LFT от low frequency of transduction — низкая частота трансдукции). Некоторые из клеток, трансдуцированных LFT-лизатом, образуют клоны, неустойчивые в отношении *Gal*, т. е. наблюдается выщепление клеток с *Gal*-генотипом реципиентной клетки. Другими словами, *Gal*-бактерия, трансдуцированная LFT-лизатом λ , несущим *Gal*⁺, обычно образует неустойчивую гетерогеноту, диплоидную и гетерозиготную в отношении локуса *Gal*, и иногда выщепляет *Gal*⁻-потомство. Мерозигота, образующаяся при лямбда-трансдукции, отличается от мерозиготы, возникающей при абортивной трансдукции с фагом P22. В последнем случае трансдуцированный фрагмент не способен к репликации: в первом же случае трансдуцированный фрагмент способен к репликации, в результате чего образуются клоны из мерозигот. Если индуцировать инфекционный фаг λ из такого лизогенного хозяина, представляющего собой мерозиготу в отношении *Gal*, образуется лизат, содержащий в сотни раз больше фага, несущего локус *Gal*, чем в случае лизата, получаемого из гаплоидных клеток. Такой лизат, богатый фагом с локусом *Gal*, способен давать высокую частоту трансдукции (HFT, high frequency of transduction).

В случае фагов, способных осуществлять общую трансдукцию, трансдуцирующий фаг можно получить из лизатов чувствительных клеток, инфицированных свободным фагом; в случае фага, способного только к ограниченной трансдукции, трансдуцирующий фаг получить таким способом невозможно. Поэтому в лизате инфицированных фагом λ нелизогенных клеток не удастся обнаружить трансдуцирующий фаг; его можно получить только из лизогенных (гаплоидных или мерозиготных) бактериальных клеток (J. Lederberg и др.; E. Wollman and F. Jacob).

Используя разные множественности и комбинации трансдуцирующих λ (выделенных из лизогенных клеток) и нетрансдуцирующих λ (выделенных вскоре после инфекции нелизогенных клеток), можно доказать, что трансдуцирующий λ является дефектным в отношении части генома (W. Arber, G. Kellenberger, J. Weigle, 1957, A. Campbell, 1964). Локус *Gal* при образовании трансдуцирующих частиц замещает сегменты λ -генома, варьирующие по размеру. Образующаяся дефектная частица *Gal*-трансдуцирующего фага λdg (λ defective *Gal*-transducing) сохраняет одни свойства фага и утрачивает другие. Частицы λdg утрачивают способность к репликации и образованию инфекционного потомства фага; профаг, образуемый такой частицей, должен быть также дефектным. Клетка хозяина, инфицированная одной частицей λdg , никогда не лизогенизируется. Следовательно, клетка, инфицированная λdg , может быть суперинфицирована нетрансдуцирующим фагом, дополни-

тельное присутствие которого делает клетку лизогенной. Функционирование этого фага позволяет размножаться дефектному профагу после индукции. Во время лизиса такой вдвойне инфицированной клетки освобождаются инфекционные частицы как нетрансдуцирующего, так и трансдуцирующего фагов. Такая ситуация напоминает описанную ранее для сальмонелл, которые не могут быть лизированы или лизогенизированы, если инфицированы только одной трансдуцирующей частицей фага P22, однако обнаруживают одно из этих явлений, когда бывают инфицированы одной или несколькими нормальными нетрансдуцирующими частицами фага P22.

Обычно трансформация не встречается у *E. coli*, что обусловлено, возможно, трудностью проникновения в клетку ДНК. Однако после выделения ДНК λdg и введения ее каким-либо способом в бактериальную клетку можно ожидать, что она будет вести себя как трансформирующее начало в отношении *Gal*-локуса. Даже если ДНК не проникает в *E. coli* сама, она может проникнуть в клетку с целым инфицирующим фагом. Это действительно получено в экспериментах (A. Kaiser, D. Hogness, 1960), в которых использовали нетрансдуцирующий фаг λ в качестве переносчика или «помощника» для ДНК, выделенной из λdg и способной осуществлять трансформацию *Gal*-маркеров.

Приведенные данные о нетрансдуцирующих фагах P22 и лямбда ясно показывают, что такие умеренные фаги, инфицирующие чувствительную бактериальную клетку, способны вести себя двояко: они либо лизируют, либо лизогенизируют своего бактериального хозяина. Как показано в случае λ , инфицирующий фаг либо остается в цитоплазме, где он реплицируется быстрее, чем хромосома, и, в конце концов, лизирует клетку и освобождает потомство фага, либо включается в хромосому, где сохраняется в виде профага и реплицируется как обычный хромосомный маркер. Соответственно, λ и большинство других умеренных фагов являются эписомами.

В чем основа различий между умеренными фагами, способными осуществлять общую трансдукцию, и теми фагами, которые способны только к ограниченной трансдукции? Ограниченно трансдуцирующий фаг обычно имеет специфический хромосомный локус для прикрепления его к хромосоме хозяина; фаг, способный к общей трансдукции, такого локуса не имеет. Совершенно очевидно, что фаговый геном — это нуклеиновая кислота, причем предполагается, что в случае фага, осуществляющего общую трансдукцию, гомологичность последовательности нуклеотидов профага и хромосомы не столь полна, как в случае фага, осуществляющего специфическую трансдукцию. В этом отношении получены заслуживающие внимания данные о том, что часть генома λ гомологична хромосоме *E. coli* (D. Cowie and B. Mc Carthy; M. Green). Это было обнаружено благодаря способности их денатурированных ДНК соединяться, образуя пары оснований друг с другом. Ряд экспериментов показывает, что профаг обеспечивает иммунитет клетки хозяина к последующим инфекциям гомологичным фагом, предотвращая не проникновение, а репликацию ДНК. Такое действие профага напоминает подавление репликации свободного фактора F включенным половым фактором.

Трансдукция, осуществляемая умеренными фагами, встречается также у *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus* и *Proteus*, и если трансдукция будет обнаружена у широкого круга других типов клеток, включая и человеческие, то это не вызовет удивления.

ЗАКЛЮЧ

Генетиче
осущест
тической

Транс
бактериа
дукции)
специфич
путем ин
трансдук
еще мож
(как *Gal* э
дукции у

Геном
замещена
во время
Больш
крепленн
свойства

ВОПРОСЫ

25.1. Д
минами м
генома.

25.2. Н
умеренный
он не ста

25.3. К
при аборт

25.4. О
память и

25.5. И
Как могли

25.6. О
вали бы дл

25.7. Им
ленность г

для микро



НОРТОН Д. ЦИНДЕР
(1954 г.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическая рекомбинация локусов бактериальной хромосомы может осуществляться с помощью умеренных бактериофагов в процессе генетической трансдукции.

Трансдуцируемый фрагмент может быть получен из любой области бактериальной хромосомы (в случае общей или неспецифической трансдукции) или из узко ограниченной области (в случае ограниченной или специфической трансдукции). Трансдуцируемый сегмент ДНК способен путем интеграции замещать хромосомный маркер хозяина (при полной трансдукции) или образовать мерозиготу. В последнем случае экзогенота еще может функционировать, независимо от того, реплицируется она (как *Gal* экзогеноты у *E. coli*) или нет (как экзогенота в abortивной трансдукции у *Salmonella*).

Геном трансдуцирующего фага лямбда дефектен. Недостающая часть замещена небольшим сегментом бактериальной ДНК, приобретаемым во время индукции профага в его последнем хозяине.

Большинство умеренных фагов — эписомы, которые, будучи прикрепленными к хромосоме, имеют некоторые свойства, напоминающие свойства включенного в хромосому F-фактора.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

25.1. Дайте определение термину *провирус*. В чем различие между терминами *мерозигота* и *гетероэнотота*? Дайте определение термину *гомоэнотота*.

25.2. Какие свойства придает клетке хозяина нетрансдуцирующий умеренный фаг, который становится профагом? Что происходит, если он не становится профагом?

25.3. Как доказать, что в микроколонии сальмонелл, образуемой при abortивной трансдукции, существует только одна экзогенота?

25.4. Обсудите утверждение: «умеренный фаг имеет хромосомную память и хромосома имеет память умеренного фага».

25.5. Известны F-частицы, которые несут профаг λ как «память». Как могли бы Вы доказать существование такой частицы?

25.6. Опишите способ и генотипы штаммов, которые Вы использовали бы для доказательства того, что *E. coli* может подвергаться генетической трансформации в отношении *Gal*.

25.7. Имеются ли какие-либо основания полагать, что тесная сцепленность генов с родственными функциями является более выгодной для микроорганизмов, чем для высших организмов?

25.8. Перечислите разные способы, с помощью которых *Gal*-локус в хромосоме *E. coli* может подвергаться рекомбинации.

25.9. Полезны или вредны умеренные фаги для бактерий? Объясните

25.10. Можно ли считать, что клетка, предположительно прекратившая мутировать, не дающая генетических рекомбинаций и не способная к саморепликации своей ДНК, еще содержит генетический материал? Объясните.

25.11. Обсудите происхождение и относительные количества частиц, присутствующих среди фаговых частиц LFT- и HFT-лизатов.

ЛИТЕРАТУРА

- W. Arber, G. Kellenberger, J. Weigle. Schweiz. Z. allgem. Pathol. und Bakteriол., 1957, 20, 659. Translated and reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 224.
- A. Campbell. Transduction, p. 49. In: «The Bacteria», v. 5, I. C. Heredity, C. Gunsalus and R. Y. Stanier (Eds). N. Y., 1964.
- F. Jacob, E. L. Wollman. Compt. rend. Acad. sci., 1954, 239, 317—319. Translated and reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. S. Stent (Ed.). Boston, 1960, p. 336.
- F. Jacob, E. L. Wollman. Genetic Aspects of Lysogeny. In: «A Symposium on the Chemical Basis of Heredity», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). Baltimore, 1957, p. 468.
- A. D. Kaiser, D. S. Hogness. The Transformation of *Escherichia coli* with Deoxyribonucleic Acid Isolated from Bacteriophage λ dg.— J. Mol. Biol., 1960, 2, 392.
- M. L. Morse, E. M. Lederberg, J. Lederberg. Transduction in *Escherichia coli* K-12.— Genetics, 1956, 41, 142. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 209.
- H. Ozeki. Abortive Transduction in Purine-Requiring Mutants of *Salmonella typhimurium*. Carnegie Inst. Wash. Publ. 612, Genetic Studies with Bacteria, 1956, 97. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 230.
- G. Stent. Molecular Biology of Bacterial Viruses. San Francisco, 1963.
- E. L. Wollman, F. Jacob. Compt. rend. Acad. Sci., 1954, 239, 455. Translated and reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. S. Stent (Ed.). Boston, 1960, p. 334.
- N. D. Zinder. Transduction in Bacteria.— Scient. Amer., 1958, 199, 38.
- N. D. Zinder, J. Lederberg. Genetic Exchange in *Salmonella*.— J. Bacteriol., 1952, 64, 679.

Морфоло-
гических *E. coli*
термофа-
гического
тела 0,1-
бактери-
гональн-
из много-
Хвостово-
ления к
спиральн-
молекула
щаться, у
его при эт
полый ци
На дистал
к которой
гнута в с
ным весо
и хвостов
каждая п
свидетельс
Сердцевид
составляю
жится вну
также пол
пептид.

Наряду
жится ДНК
Эта ДНК
ствует пр
должен им
скручена
не обнару
Не все
не ДНК, а
туры Т-чет
тительные
турнесса, л
структуру.
структуру,
ДНК, обла
вать в кач
Идентиф
осуществля
жит серы,
ДНК в од
в клетки х

23 и Гершков

БАКТЕРИОФАГ.
РЕКОМБИНАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ КАРТЫ

Морфология бактериофагов Т-четной группы (Т2, Т4, Т6), инфицирующих *E. coli*, изучена довольно подробно (S. Brenner et al., 1959). Бактериофаги этой группы напоминают по форме головастиков с длиной тела 0,1—0,2 мк, что составляет приблизительно десятую часть диаметра бактериальной клетки (рис. 26—1). Поверхность головки имеет гексагональный контур и грани, подобно кристаллу. Мембрана головки состоит из многочисленных субъединиц, молекулярный вес которых около 80 000. Хвостовой отросток цилиндрической формы служит фагу для прикрепления к клетке хозяина. Внешний чехол хвоста состоит примерно из 200 спирально расположенных субъединиц, образующих полый цилиндр; молекулярный вес этих субъединиц около 50 000. Чехол может сокращаться, укорачиваясь в длину и увеличиваясь в диаметре, так что объем его при этом заметно не изменяется. Внутри чехла находится сердцевина — полый цилиндр с центральным каналом, имеющим около 25 Å в диаметре. На дистальном конце сердцевины расположена гексагональная пластинка, к которой прикреплены шесть хвостовых нитей; каждая из нитей изогнута в середине и, по-видимому, содержит субъединицы с молекулярным весом не менее 100 000. Субъединицы мембраны головки, чехла и хвостовых нитей состоят из белка. При переваривании трипсином каждая из таких субъединиц образует ряд уникальных пептидов, что свидетельствует о том, что все эти субъединицы отличны друг от друга. Серцевина также состоит из белка. Серологически отличимый белок, составляющий от 4 до 6% от общего количества фагового белка, содержится внутри фаговой частицы; внутри фаговой частицы обнаружены также полиамины, путресцин, спермидин, лизоцим и минорный полипептид.

Наряду с этими компонентами внутри частицы Т-четного фага содержится ДНК, объем которой приблизительно равен объему всего белка. Эта ДНК состоит из одной двойной спирали, длина которой соответствует примерно 200 000 нуклеотидов. Так как такой полинуклеотид должен иметь длину около 68 мк, ДНК внутри фага, по-видимому, сильно скручена (R. Kilkson, M. Maestre, 1962). РНК в ДНК-содержащих фагах не обнаружена.

Не все фаги содержат ДНК; в некоторых бактериофагах имеется не ДНК, а РНК. Более того, сложность физической и химической структуры Т-четных фагов нетипична для всех вирусов. Определенные растительные вирусы, такие, как вирусы табачной мозаики и желтой мозаики турнепса, имеют относительно простую спиральную или сферическую структуру. Хотя фаг ф X 174, по-видимому, имеет простую сферическую структуру, близко родственный ему фаг ф R, несущий однонитчатую ДНК, обладает небольшой выпуклостью, которая может функционировать в качестве хвоста.

Идентификация генетического материала в ДНК-содержащих фагах осуществляется довольно просто благодаря тому, что ДНК фага не содержит серы, а белок фага Т2 не содержит фосфора. Херши и Чейз метили ДНК в одном из образцов фага радиоактивным P^{32} путем введения его в клетки хозяина, а белок другого образца фага метили путем введения

в бактериальные клетки радиоактивной серы, S^{35} . Затем оба образца были использованы для заражения немеченных клеток. Были получены следующие результаты: в одном образце весь P^{32} (а, следовательно, и вся ДНК) входит в бактериальную клетку; в другом образце вся меченая сера, S^{35} , за исключением примерно 3% (а, следовательно, почти весь белок), остается вне клетки и может быть удалена при обработке в микросмесителе. Как уже указывалось ранее, удаление большей части белка прикрепленной фаговой частицы с поверхности клетки хозяина путем обработки в блендоре не влияет на нормальное течение инфекции. Эти результаты согласуются с предположением, что именно ДНК, а не белок, является носителем генетической информации фага.

Напомним, что чистая ДНК сама не способна проникнуть в нормальные клетки *E. coli*. При соответствующих условиях культивирования *E. coli* можно удалить клеточную оболочку, в результате чего остаются протопласты, в которые может проникать очищенная ДНК. Чистую ДНК можно получить, удалив всю белковую оболочку фага обработкой фенолом, $CaCl_2$ или каким-либо другим способом. При смешивании протопластов *E. coli* с такой очищенной одонитчатой ДНК фага фХ174 (который содержит только около 4500 дезоксирибонуклеотидов на частицу) образуется потомство, типичное для фага фХ174, включая характерную белковую оболочку (G. Guthrie, R. Sinsheimer, 1963). Следовательно, единственным генетическим материалом в ДНК-содержащем фаге является ДНК.

Ряд событий, приводящих к лизису инфицированной фагом бактерии, может быть суммирован следующим образом (рис. 26—2): фаговая частица прикрепляется с помощью хвоста к специфическим рецепторам на поверхности бактериальной клетки. В клетку впрыскивается вся ДНК с незначительной примесью белка; вероятно, впрыскивание производится в результате сокращения спирального белкового чехла. После

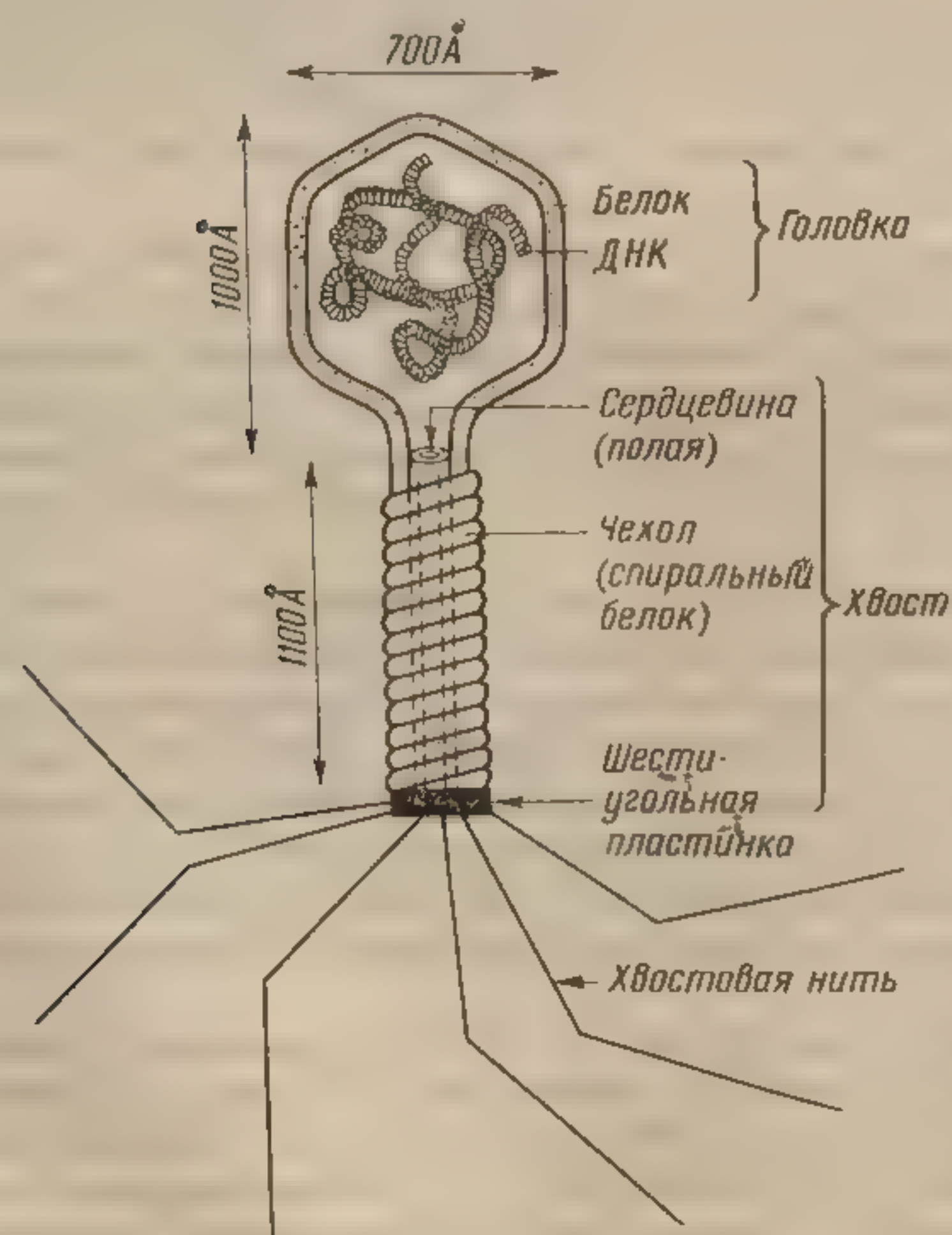


РИС. 26-1.
Схематическое изображение структуры интактных и активированных T-четных фагов *E. coli*

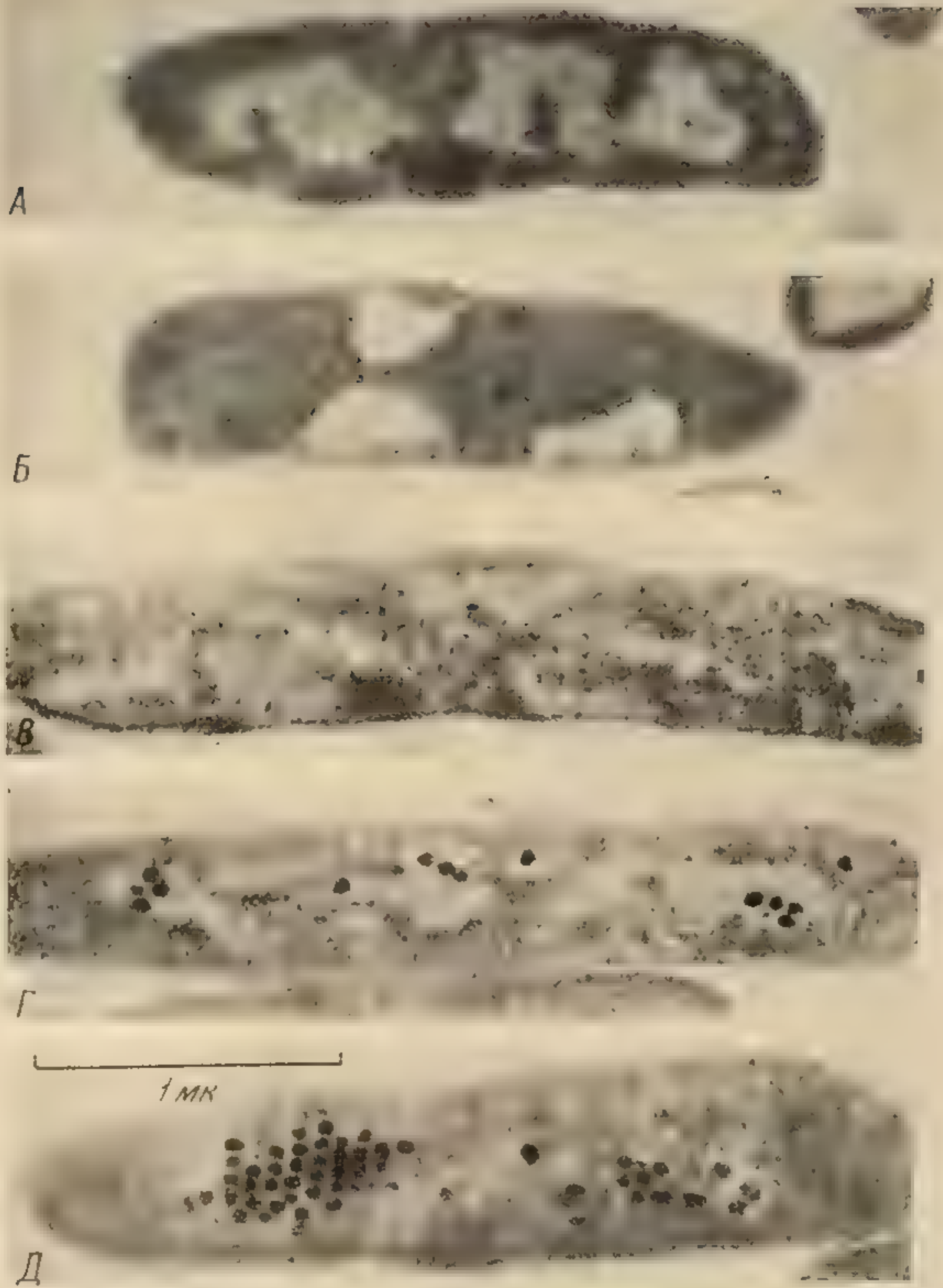


РИС. 26-2.

Электронные микрофотографии, показывающие размножение вируса *T2* в клетке *E. coli*.

А — клетка перед заражением; Б — клетка спустя 4 мин. после заражения; В — клетка через 10 мин. после заражения; фотография тонкого среза показывает также белковый чехол *T2*, прикрепленный к бактериальной поверхности; Г — клетка через 12 мин. после заражения; наблюдается конденсация новых вирусных частиц; Д — 30 мин. после заражения; полностью сформировано уже более 50 частиц фага *T2*. Клетка почти готова к лизису (фото Е. Kellenberger)



РИС. 26-3.

Бляшки, образуемые родительскими и рекомбинантными типами фага.

Потомство фага от скрещивания между hr^+ и h^+r проверялось на смеси соответствующих индикаторных бактерий. Мелкие прозрачные и большие мутные бляшки образованы родительскими типами потомства фага (h^+r и h^+r соответственно). Большие прозрачные и мелкие мутные бляшки образованы рекомбинантными типами потомства (hr и h^+r^+ соответственно) (фото А. Hershey)

прони
Б —
ся об
циров
разуе
часть
При з
(содер
после
получ
и осв

Эти
фага —
ных, ф
можны
в бакт
тате че
что да
цирует
клетки

ВИРУЛ

Методы
те, осн
рии. О
что пов
ными б
и непро
бацпей
инфици
рует хо
Эти час
с клетк
этого ц
лизиса,
на бакте
от одной
ветствуе

Внеп
тичности
бляшки
чатся
характер
Поэтому
которые
способно
у которых
Поэтому
цифичес

Можн
ным как
бляшки
дикого т
руются о
типа псп
из двух

проникновения в клетку ДНК следует *скрытый период* (eclipse) (рис. 26—2 Б — Г), во время которого в искусственно лизированной клетке не удается обнаружить инфекционного фага. Во время скрытого периода инфицированные клетки несут *незрелый фаг*; реплицирующаяся фаговая ДНК образует пул фаговых единиц ДНК. В конце скрытого периода (рис. 26—2, Д) часть ДНК, находящейся в пуле, начинает образовывать зрелый фаг. При этом каждый геном окружается вновь синтезированной оболочкой (содержащей головку и хвост) (рис. 26—2, Г). Примерно через 20—40 мин. после начала инфекции инфицированные бактерии образуют ферменты, получившие название *эндолизин*ов, которые разрушают оболочку клетки и освобождают инфекционный фаг в среду.

Этим последним событием заканчивается *литический цикл* бактериофага — единственно возможный цикл для *неумеренных*, или *вирулентных*, фагов, таких, как Т. Для умеренных фагов это один из двух возможных циклов. Альтернативой ему является интеграция вошедшего в бактериальную клетку фага в хромосоме в качестве профага, в результате чего клетка становится лизогенной и иммунной. Однако напомним, что даже в этом случае профаг иногда отделяется от хромосомы и реплицируется, образуя инфекционный фаг, освобождающийся при лизисе клетки хозяина.

ВИРУЛЕНТНЫЕ ФАГИ

Методы определения количества фаговых частиц, присутствующих в лизате, основаны на способности вируса лизировать чувствительные бактерии. Один из наиболее часто используемых методов заключается в том, что поверхность чашки, содержащей агар, густо засеивается чувствительными бактериями, которые при инкубации растут, образуя сплошной и непрозрачный газон. Когда с чувствительными бактериями перед инкубацией смешивают несколько частиц вирулентного фага, каждая частица инфицирует отдельную бактерию, развивается там и впоследствии лизирует хозяина с освобождением нескольких сотен частиц дочернего фага. Эти частицы продолжают инфицировать бактерии, находящиеся рядом с клеткой исходного хозяина, вызывая позднее их лизис. Повторение этого цикла ведет к образованию прогрессивно увеличивающейся зоны лизиса, которая обнаруживается в виде *стерильного пятна*, или *бляшки*, на бактериальном газоне. При этих условиях каждая бляшка произошла от одной родительской фаговой частицы, поэтому подсчет бляшек соответствует подсчету фаговых частиц в инфицирующем образце.

Внешний вид бляшек зависит от среды, хозяина и фага. При идентичности других факторов различные мутанты фага могут образовывать бляшки с характерно отличающейся морфологией. Бляшки могут отличаться размером, мутностью, присутствием или отсутствием ореола, характером краев и (при применении красок, добавляемых в агар) цветом. Поэтому исследователь может определять и выделять мутанты фага, которые влияют на тип бляшки. Генетически фаги могут отличаться способностью инфицировать определенных хозяев. Встречаются мутанты, у которых меняется эта способность, а, следовательно, и круг хозяев. Поэтому могут быть определены и выделены мутации, влияющие на специфичность по отношению к хозяину.

Можно получить штамм вирулентного фага Т, являющийся мутантом как в отношении *специфичности к хозяину* (*h*-мутация), так и *типа бляшки* (*r*-мутация). Для определения частоты мутирования к аллелям дикого типа (*h*⁺ и *r*⁺) чувствительные бактериальные клетки инфицируются одной фаговой частицей, содержащей оба маркера; фаги дикого типа используются для определения частот мутирования к каждому из двух типов мутантных аллелей. При заражении чувствительного

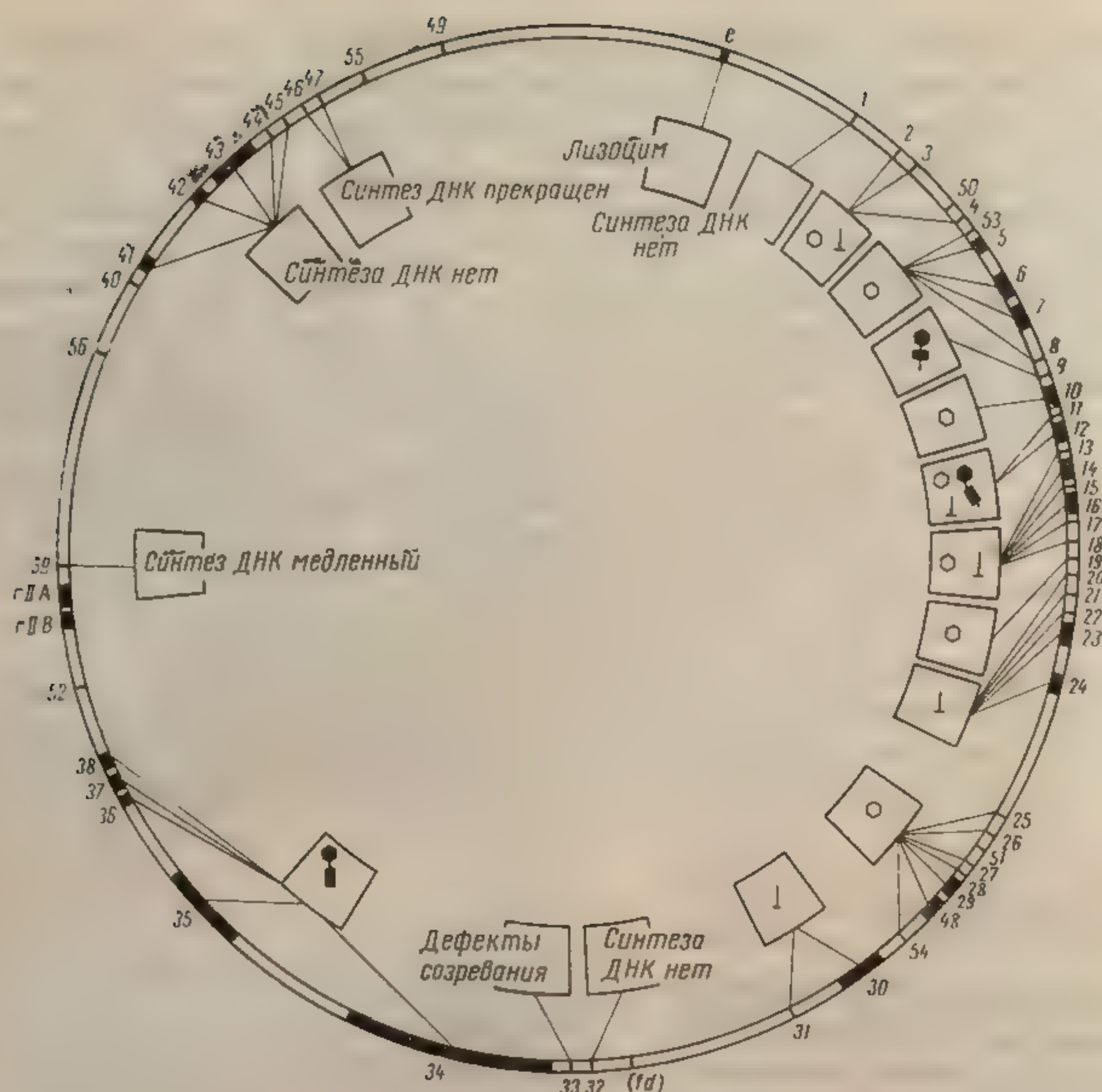


РИС. 26-4.

Рекомбинационная карта флага Т4Д.

Зачерненные зоны показывают минимальные размеры генов. Обозначения фоговых компонентов соответствуют типичным морфологическим компонентам, обнаруживаемым в лизатах *E. coli*, инфицированных мутантами (Genetics, 1964, 50, 539—552)

бактериального штамма высоко концентрированной смесью двойного мутантного (hr) и дикого (h^+r^+) фагов, некоторые множественно инфицированные клетки несут оба типа фагов. В этом случае среди потомства удастся обнаружить не только родительские типы (hr и h^+r^+), но и рекомбинантные типы (h^+r и hr^+), встречающиеся с частотой, значительно превышающей частоту мутирования (рис. 26—3). Следовательно, подобные эксперименты (M. Delbrück a. W. Bailey, A. Hershey a. R. Rotman) доказывают, что во множественно инфицированной клетке между фаговыми частицами происходит генетическая рекомбинация. Определение относительной частоты появления различных рекомбинантов среди фага, освобождаемого клетками, множественно инфицированными серией различных мутантов (эта процедура известна как «скрещивание» генетически различных фагов), позволяет построить генетическую карту фага. После того как это было сделано с фагом Т4, было обнаружено, что мутантные локусы расположены в одной линейной группе сцепления, замкнутой в виде кольца (рис. 26—4).

Поскольку r -мутант фага Т4 вызывает быстрый лизис, он образует большие бляшки с более четкими краями, чем фаг, несущий аллель дикого типа r^+ . Смешанные инфекции фагами r и r^+ обычно дают потомство, образующее бляшки одного или другого типа. Однако среди них появляются крапчатые бляшки (около 2%), т. е. бляшки, которые частично, по-видимому, r и частично r^+ . При изучении фагов (взятых уколом)

из кр
бляш
не мо
г-лок
циров
не об
бильн
чески
гих р
А. До
чатые
тами
го г-л
Отд
ряда л
В дей
была
таются
(G. Str
частью
нительн
ной ДН

ТОШКА

Мутаци
ты Т4
Мута
образов
на. Одн
тем, что
стве хоз
тогда ка
(табл. 2
ности п
поврежд

Ограни
можно ис
от гII к г
Последую
аера (1955

из крапчатой бляшки оказалось, что они образуют либо r , либо r^- тип бляшек. Так как в крапчатой бляшке представлены оба родителя, она не могла произойти от одной фаговой частицы, гаплоидной в отношении r -локуса. Образование крапчатых бляшек не обусловлено также инфицированием несколькими фаговыми частицами; более того, такие бляшки не образованы фагом, несущим нестабильную r -мутацию, так как нестабильные r -фаги образуют фенотипически (а следовательно и генотипически) секториальные, а не крапчатые бляшки. На основании этих и других результатов сделан вывод (A. Hershey and M. Chase, 1951; также A. Doermann and L. Boehner, 1963), что 2% фага T4, образующего крапчатые бляшки при смешанном инфицировании, представлены гетерозиготами в отношении короткого отрезка фагового генома, включающего r -локус.

Отдельная фаговая частица может быть гетерозиготной в отношении ряда локусов, которые расположены достаточно далеко друг от друга. В действительности маловероятно, чтобы какая-либо из фаговых частиц была полностью гаплоидна. Области, являющиеся диплоидными, считаются избыточными. Избыточность может встречаться в двух видах (G. Streisinger, R. Edgar and G. Denhardt, 1964): либо обе области являются частью одной двуспиральной ДНК (концевая избыточность), либо дополнительная область представлена в виде отдельного сегмента двуспиральной ДНК (внутренняя избыточность).

ТОНКАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ФАГА T4¹

Мутации r встречаются в трех различных областях генетической карты T4 — rI , rII и $rIII$.

Мутанты, несущие r -мутации в любой из трех областей, способны образовывать бляшки на штамме *B. coli*, используемом в качестве хозяина. Однако мутанты, несущие повреждение в rII области, отличаются тем, что они не способны образовывать бляшки при использовании в качестве хозяина штамма K12 *E. coli*, который лизогенен в отношении лямбда, тогда как rI и $rIII$ мутанты, а также r^+ -фаги образуют на нем бляшки (табл. 26—1). Следовательно, среди r -мутантов ограничения в специфичности по отношению к хозяину проявляют только те, которые несут повреждения в области II.

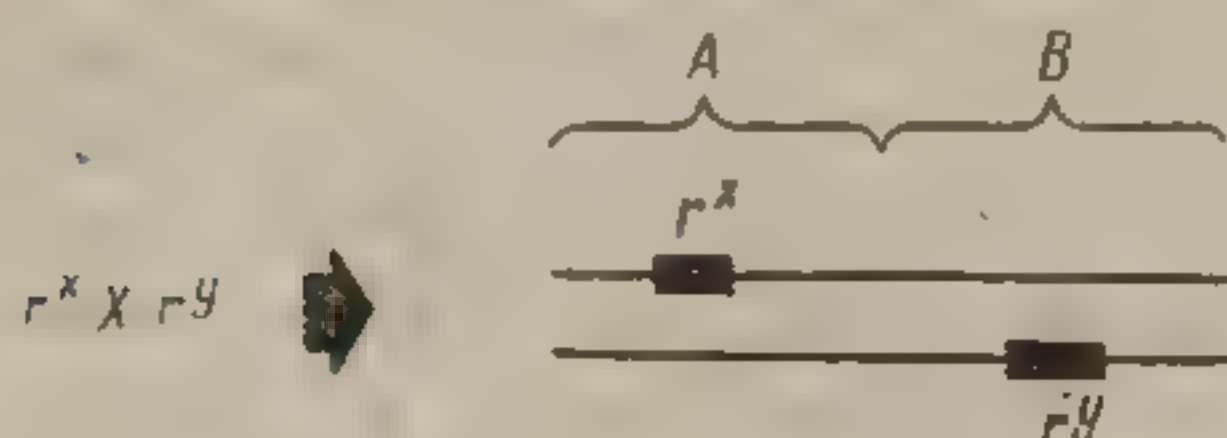
Таблица 26—1
ХАРАКТЕР БЛЯШЕК r -МУТАНТОВ
T-ЧЕТНЫХ ФАГОВ НА ШТАММАХ В
и K *E. coli*

| Генотип | Бляшки, образуемые на штамме-хозяине | |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------|
| | B | K |
| Мутанты rI и $rIII$ | r | r |
| Мутанты rII | r | Не образуют |
| r^+ | + | + |

Ограниченную в отношении к хозяину специфичность мутанта rII можно использовать в качестве селективного маркера. Частота мутаций от rII к rII^+ может быть легко определена при расसेве T4 rII на штам-

¹ Последующее изложение основано главным образом на материалах работ С. Бензера (1955, 1957).

Функциональная комплементация



Отсутствие комплементации



РИС. 26-5.

Наличие или отсутствие комплементации между различными r II-мутантами

ме K12, так как только мутанты r^+ будут образовывать бляшки (r^+ — селектируемый па K12 маркер). Можно выделить большое число r II-мутантов, которые имеют низкую частоту мутаций (иногда ниже, чем 1 на 10^8 фаговых частиц). Мутанты T4 r II могут быть разделены на два класса, A и B, согласно их поведению после смешанной инфекции штамма K12. Если K12 инфицирован r II-фагами из обоих классов, происходит размножение фага и лизис хозяина. Это свидетельствует, что r II-область состоит из двух функциональных единиц, A и B, и для получения нормального r^+ -фенотипа необходимо присутствие продуктов обеих единиц. Мутанты, несущие дефект только в A-единице, по-видимому, еще способны образовывать нормальный продукт B, и наоборот. В бактериальных клетках, множественно инфицированных фаговыми мутантами, одни из которых несут повреждения в A-, а другие в B-единицах, образуемые мутантами продукты A и B могут кооперироваться, т. е. проявлять комплементацию, давая r^+ -фенотип (рис. 26—5).

Если два разных r II-мутанта, участвующие во множественном инфицировании штамма K12, несут повреждения в одной и той же области, например, области A, они оказываются неспособными давать r^+ -фенотип путем комплементации, так как ни один из фагов не может образовать нормальный A-продукт. В таких случаях фаг не может расти и не будет лизировать хозяина, если только у инфицирующих мутантов повреждения в области A не находятся на значительном расстоянии друг от друга, так что потомство дикого типа может возникнуть в результате рекомбинации между ними.

Два мутанта, $r1$ и $r2$, возникшие независимо в одной и той же области, могут не рекомбинировать друг с другом; однако $r1$ может рекомбинировать с третьим независимым мутантом, $r3$, даже если мутант $r2$ не рекомбинирует с ним. Эти результаты показывают, что мутант $r2$ имеет большую недостаточность, или делецию, которая захватывает всю или часть области, дефектной по $r1$ и $r3$. Такие мутанты с делециями никогда не ревертируют к r^+ . Другие мутанты, которые ревертируют и не имеют больших делеций, рассматриваются как точечные мутанты. При проверке более 1500 спонтанно встречающихся r II-мутантов около 300 из них оказались неидентичными, т. е. разделимыми при рекомбинации (рис. 26—6). С помощью перекрывающихся делеций и точечных мутантов можно расположить все мутантные участки A- и B-областей в одной линейной последовательности, причем расстояния между мутантами приблизительно аддитивны. Следовательно, даже в отношении тонкой структуры (в пределах одного «гена») генетическая рекомбинационная карта бактериофага является линейной.

Возм
ме K12
она сост
тивность
ведено м
рекомби
тельно
частота,
бинации
т. е. зна
делимости

Чтобы
маркерам
дует допу
1) вер
лярной д
2) изу
3) общ

вания ря
На осн
тической
бинации;
шении к
ная карта
быть длин
ных едини
что соответ
ложены в
ных нукле

Отноше

процент р
рекомбина
следует по
точек, в ко
дать, что
от дикого

r^+ -рекомби

(двойной м
будет встре

Допустим
рекомбина
означать, чт
точке и что
мутантов от
полагая, что
можно утвер
точка будет
длина средн
дам. Поскол
значением д
не располага
ской карты
тидной длин
в значительн
каких-либо

Возможность отбора r^- реверсий путем рассева r^{II} мутантов на штамме K12 позволяет производить определение частоты мутаций, даже если она составляет 1 на 10^6 . Этот метод имеет приблизительно ту же эффективность при определении рекомбинантов. Несмотря на то что было проведено множество скрещиваний, самая низкая воспроизводимая частота рекомбинаций между двумя мутантами (0,02%) оказалась относительно высокой, по крайней мере в 100 раз выше, чем самая низкая частота, доступная определению. Следовательно, в отношении рекомбинации частота 0,02%, по-видимому, близка к самому нижнему пределу, т. е. значению, которое может быть использовано при оценке предела делимости ДНК при рекомбинации.

Чтобы оценить наименьшее нуклеотидное расстояние между двумя маркерами T4, которые способны рекомбинировать друг с другом, следует допустить следующее:

- 1) вероятность генетической рекомбинации постоянна по молекулярной длине генетической карты фага;
- 2) изучаемые генетические маркеры должны представлять все локусы;
- 3) общая длина генетической карты точно оценивается путем суммирования ряда малых расстояний.

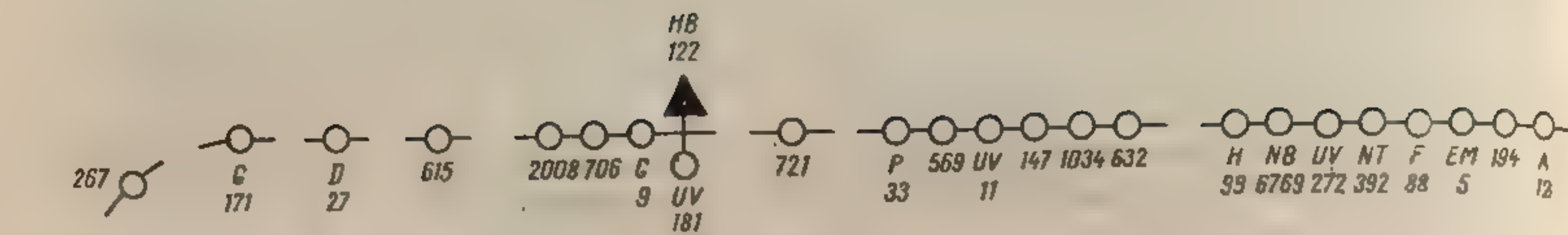
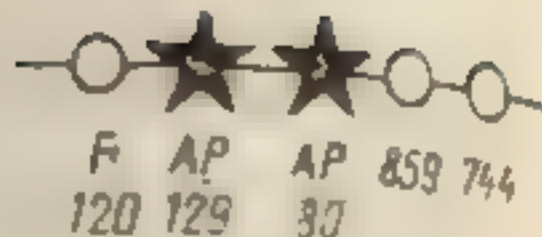
На основе этих допущений было рассчитано, что длина общей генетической карты фага T4 составляет приблизительно 2500 единиц рекомбинации; иными словами, она показывает 2500% рекомбинации в отношении к ее общей генетической длине. (Напомним, что рекомбинационная карта, построенная на основании данных по кроссинговеру, может быть длиннее ста рекомбинационных единиц — в этом случае кроссоверных единиц). Молекулярный вес ДНК фага T4 равен $130-160 \times 10^6$, что соответствует содержанию примерно 400 000 нуклеотидов. Они расположены в виде одной двойной спирали из 200 000 линейно расположенных нуклеотидов.

Отношение $\frac{2500\% \text{ рекомбинантов}}{200\,000 \text{ нуклеотидов}}$ составляет 0,0125% и выражает собой процент рекомбинаций на нуклеотидную пару. Исходя из того, что рекомбинация не может происходить в пределах нуклеотидной пары, следует полагать, что фаговый геном содержит 200 000 межнауклеотидных точек, в которых может происходить обмен. Таким образом, можно ожидать, что в случае скрещивания двух r^- -мутантов (каждый отличается от дикого типа одним соседним нуклеотидом) частота возникновения r^+ -рекомбинантов среди потомства составит $\frac{0,0125\%}{2}$, или 0,00625%

(двойной мутантный рекомбинант, не определяемый в этом случае, также будет встречаться с такой частотой).

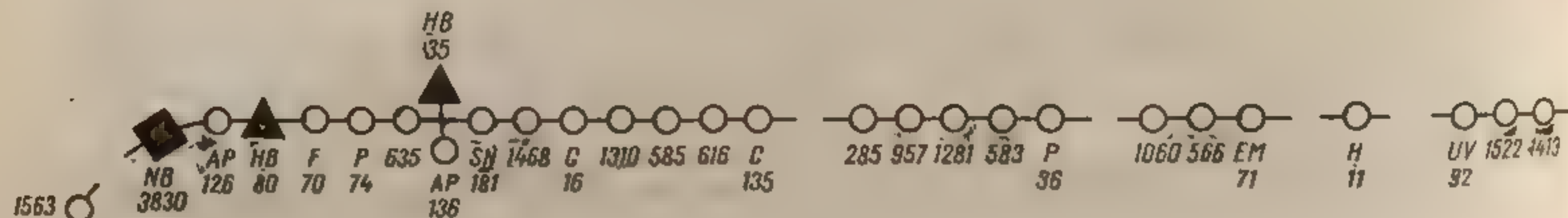
Допустим, что наиболее низкая наблюдаемая частота появления r^+ -рекомбинантов, 0,02%, действительно является минимальной. Это должно означать, что рекомбинация могла произойти в каждой межнауклеотидной точке и что наиболее близкие мутации у многочисленных проверенных мутантов отделены примерно тремя нуклеотидами (0,02/0,00625). Предполагая, что мутации повреждают действительно соседние нуклеотиды, можно утверждать, что в среднем только каждая третья межнауклеотидная точка будет способна подвергаться рекомбинации и, следовательно, длина средней единицы рекомбинации должна равняться трем нуклеотидам. Поскольку наблюдаемая величина 0,02% является максимальным значением для выражения наименьшего количества рекомбинаций, а мы не располагаем определенными данными относительно длины генетической карты и числа нуклеотидов в геноме фага, расчет средней нуклеотидной длины, составляющей единицу рекомбинации, может быть еще в значительной мере ошибочным. Остов ДНК, по-видимому, не несет каких-либо структурных различий, которые указывали бы только

Цистрон А



2044
1176

1140



1563
D2
612
704
866
UV 200
D11

173

395 661

UV 1777 118

359

240

NT 470

1941 C 182

391 279 539 1316 1702 C 181 91

SD 596 131 1394 HB 129

271 155

385 NT J 518 321

HB 84

106

1221 N 1196 1643 N 12 10 536 G 426 UV J 980 F 609 B P 1948 N F F F F 1107 C 185

BC 35

38

1467 SN 168

B6

B5

B4b2

1262

J 241

NT 23

689

1755

163

H 113

B 13

EM 16

530 A 84

SD 123 EM UV 1985 121 113 363

N AP 864 C EM 29 SD

P 1960 NT 979 NB SD 935 B ED6 UV EM 8 EM 83 284 681 41 57 50 124 34 133

B8

B9a1a

B9a1b

B9a2

B9b

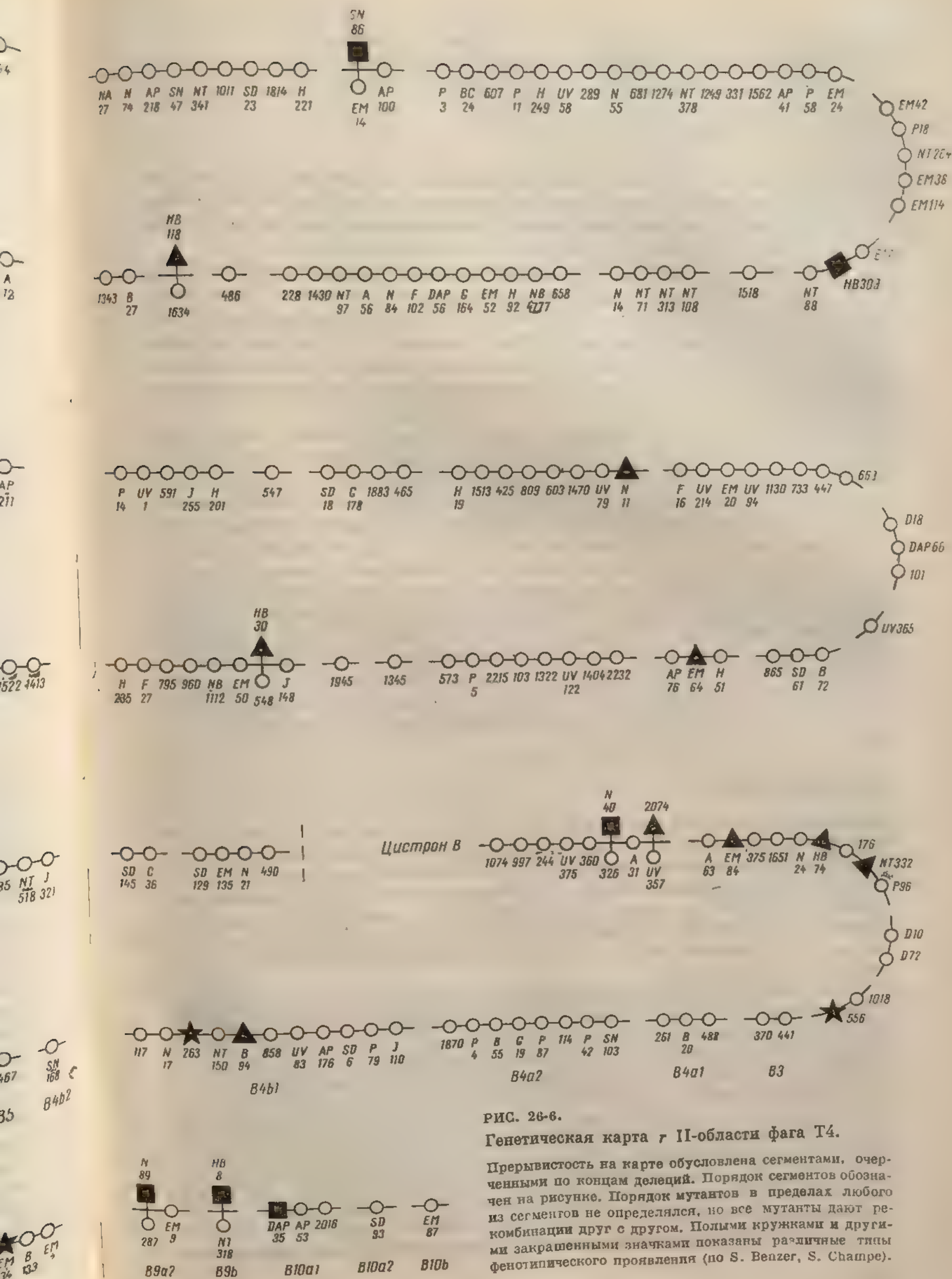


РИС. 26-6.

Генетическая карта r II-области флага Т4.

Прерывистость на карте обусловлена сегментами, очерченными по концам делеций. Порядок сегментов обозначен на рисунке. Порядок мутантов в пределах любого из сегментов не определялся, но все мутанты дают рекомбинации друг с другом. Полыми кружками и другими закрашенными значками показаны различные типы фенотипического проявления (по S. Benzer, S. Champe).

$$\frac{a_1 \quad a_2}{+ \quad +}$$

$$\frac{a_1 \quad +}{+ \quad a_2}$$

РИС. 26-7.

Цис- (слева) и транс- (справа) положения для двух мутантов в цистроне rIIA

на каждый третий нуклеотид. Поэтому кажется вполне допустимым принять в качестве рабочей гипотезы, что *наименьшей единицей рекомбинации у фага является один нуклеотид*. Эта точка зрения находит свое подтверждение в работах Хелинского и Яновского (1962).

Вся область rII содержит около 200 линейно расположенных нуклеотидов. Рассмотрим функциональные свойства этой области. Если иметь в виду образование только r и r⁺-фенотипов, то rII-область ведет себя как одна функциональная единица. Однако область rII состоит из двух единиц, А и В, которые способны комплементировать. Такое разделение позволяет считать, что А и В — это независимые отдельные единицы на функциональном уровне.

При двойном инфицировании *E. coli* K12 фагом дикого типа (++) и двойным мутантом T4 (a₁a₂), несущим оба повреждения в А (или В)-области, образуется r⁺-фенотип. В этом случае мутации расположены в одной и той же двойной спирали ДНК, находясь в *цис-положении* (рис. 26—7). Если штамм K12 вдвойне инфицирован, причем каждая частица вируса несет одну из этих мутаций (a₁+, +a₂), мутации находятся в *транс-положении*. Комплементации не происходит, бляшки не образуются. В тех случаях, когда *цис-транс тест* дает такой результат, полагают, что два мутанта, неспособные комплементировать в транс-положении, принадлежат к одной функциональной (А или В)-единице, или *цистрону*. Наиболее близко расположенные мутационные участки А и В-цистронов (см. рис. 26—5) находятся на расстоянии не более 0,4 единицы длины карты. Это свидетельствует о том, что два цистрона не отделены большим количеством ДНК, внутри которой могут встречаться рекомбинации.

УМЕРЕННЫЕ ФАГИ

Генетическая рекомбинация может происходить также между умеренными фагами. На основании частоты встречаемости генетически рекомбинантных фагов среди потомства, освобождаемого чувствительными клетками, множественно инфицированными различными мутантами λ, можно расположить мутанты на одной карте сцепления, точно так же, как это сделано в отношении различных мутантов вирулентных Т-фагов. Оказалось, что в отличие от фага T4, генетическая карта фага λ (как и у T5) не является кольцевой.

Умеренный фаг отличается от неумеренного тем, что он способен лизогенизировать своего хозяина. При инфицировании чувствительных бактерий умеренными фагами образующиеся бляшки имеют мутный центр, что обусловлено ростом лизогенизированных (не лизирующихся) бактерий. У такого умеренного штамма фага встречаются мутанты с меньшей или утраченной способностью к лизогенизации (в этом случае фаг становится вирулентным). Такие мутанты образуют менее мутные или прозрачные бляшки. Скрещивания между фагами, которые несут мутации в отношении различной степени вирулентности и другие маркеры, показывают, что локусы, контролирующие способность к лизогенизации, являются определенной частью генетической карты фага.

Некоторые мутации повреждают, по-видимому, процесс, с помощью которого фаг превращается в профаг. Мутанты последнего типа обозна-

чаются н
не локус
мутаций
ции в с₁
и поэтому
ки. Мута
незначито
выражена
типа. Кр
личное в

У *E.*
индуциру
Все виру
различные
мосомы х
тем, что х
инфициро
Непор
ции. Она
умеренным
введен в н

¹ Вышеприв

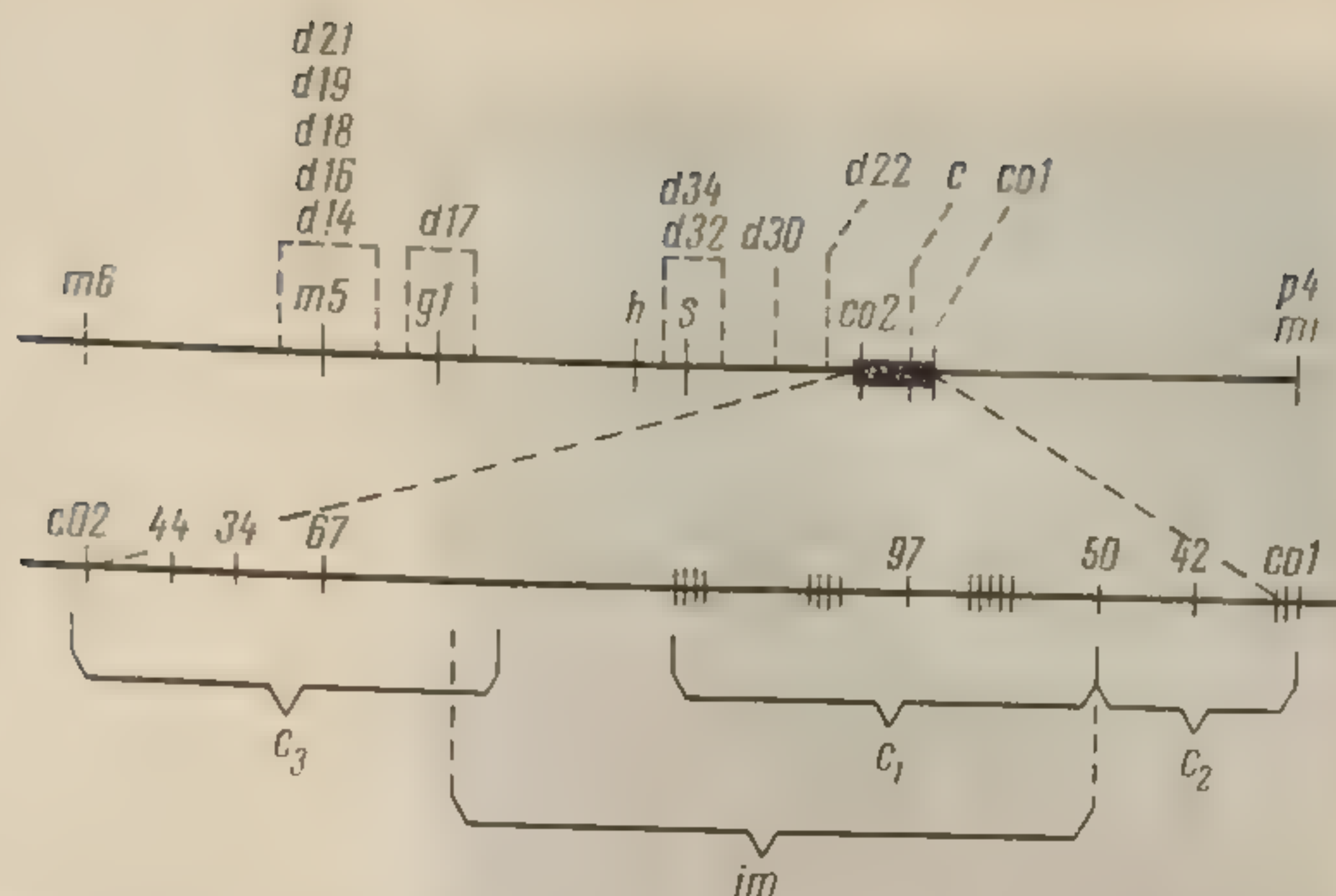


РИС. 26-8.

Схематическое изображение группы сцепления умеренного бактериофага λ .

На верхней диаграмме показан линейный порядок различных маркеров в отношении специфичности к хозяину или размера и типа бляшек. Буквой d обозначены специфичные дефектные мутанты. Область, жирной линией показана подробнее на нижней диаграмме. Она состоит из трех сегментов — c_3 , c_1 , c_2 ; im — сегмент, контролирующий иммунитет (по Ф. Жакобу и Д. Моно)

чаются как *c*-мутанты (clear — прозрачные). Они несут мутации в группе локусов на генетической карте фага. У фага лямбда три группы *c* мутаций располагаются в последовательности c_3 , c_1 , c_2 (рис. 26—8). Мутации в c_1 -сегменте сопровождаются потерей способности к лизогенизации и поэтому мутанты, несущие их, образуют совершенно прозрачные бляшки. Мутанты, имеющие повреждения в c_3 и c_2 -сегментах, сохраняют незначительную способность к лизогенизации, которая может быть выражена как 0,1—0,01% от лизогенной способности фага лямбда дикого типа. Кроме того, было показано, что все три локуса действуют в разное время после инфекции.



РИС. 26-9.

Часть карты сцепления *E. coli*, показывающей расположение некоторых индуцированных профагов

У *E. coli* выделено более 12 умеренных фагов. Некоторые из них индуцируются ультрафиолетовыми лучами, другие не индуцируются. Все вирусы, чьи профаги являются индуцируемыми (их 7), занимают различные хромосомные локусы, расположенные в одной области хромосомы хозяина (рис. 26—9). Эти фаги отличаются друг от друга также тем, что хозяин, лизогенный в отношении одного из них, еще может быть инфицирован какими-либо другими¹.

Neisseria meningitidis является культурой, способной к трансформации. Она может быть также инфицирована индуцируемым УФ-лучами умеренным фагом НР1. Генетический материал этого фага может быть введен в нелизогенную культуру *Neisseria meningitidis*, компетентную в отношении

¹ Вышеприведенное обсуждение основано на ряде работ Ф. Жакоба и соавторов.



СЕЙМУР БЕНЗЕР
(1961 г.)

трансформации, тремя способами: впрыскиванием из неповрежденной фаговой частицы; инфицированием чистой ДНК фага; и, наконец, инфицированием чистой бактериальной ДНК, несущей профаг, которая выделена из лизогенных клеток. В каждом случае клетка хозяина либо становится лизогенной, либо лизируется и освобождает зрелое потомство фага (W. Harm a. C. Rupert, 1963).

Несмотря на то что свойство иммунности, определяемое профагом, контролируется небольшой областью, составляющей лишь часть общего содержания ДНК в фаге — c_1 -областью — одна эта область не содержит всей генетической информации или спецификации, необходимой для перехода профага в состояние зрелого инфекционного фага. По-видимому, большинство остальных локусов фага (а возможно, и все) являются существенными для образования зрелого фага, включая его объединение с белковыми частями.

Используя немеченые клетки хозяина, можно провести скрещивание между генетически различными штаммами фага лямбда, один из которых помечен изотопами C^{13} и N^{15} , а другой — немеченый. После ультрацентрифугирования в градиенте плотности определяют распределение меченой родительской ДНК как исходного родительского фага, так и рекомбинантных генотипов. В таких экспериментах в рекомбинантных фагах обнаружены дискретные количества исходной родительской ДНК (M. Meselson a. J. Weigle, 1961; G. Kellenberger, M. Zichichi a. J. Weigle, 1961). Наиболее простое объяснение такого результата основывается на предположении, что рекомбинанты образуются после разрыва и воссоединения родительских нитей ДНК. Эти результаты не подтверждают (но и не исключают) вероятности того, что рекомбинации у фага осуществляются посредством механизма «ошибочного копирования», так как в этом случае вся ДНК рекомбинантного фага должна была бы содержать целиком новый немеченый материал.

ЗАК.

Обсу.
разви
матер
инфи
генет
реком

Ре
ную
ца. Р
сти, I

Из
бинац
ласти
что на

Ген
умерен
не явл
стью
нация
тельск

ВОПРОС

26.1
достат

ных сл
ДНК

26.2
бактер

26.3
личных

26.4
можно

26.5
ФХ174



А. ХЕРШИ
(1960 г.)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обсуждаются данные о морфологическом строении и литическом цикле развития вирулентных Т-четных фагов *E. coli*, а также их генетическом материале, химически определяемом как ДНК. После множественного инфицирования клеток фаговыми частицами Т4, несущими различные генетические маркеры, среди потомства обнаруживаются генетические рекомбинанты.

Результаты скрещивания фага позволяют построить рекомбинационную карту Т4 с линейным расположением генов, замкнутую в виде кольца. Рекомбинантные фаги часто диплоидны в отношении короткой области, несущей рекомбинантные маркеры.

Изучение обратных мутаций, комплементации и генетической рекомбинации позволило обнаружить тонкую генетическую структуру rII -области фага Т4. Данные этих исследований позволяют предположить, что наименьшей единицей рекомбинации у фага является один нуклеотид.

Генетическая рекомбинация наблюдается также между мутантами умеренного фага. У фага лямбда единственная группа сцепления не является кольцевой. Иммуниет к суперинфекции определяется областью c_1 генетической карты фага. Иногда (если не всегда) рекомбинация у фага происходит в результате разрыва и воссоединения родительских нитей.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

26.1. Является ли отверстие в хвостовом отростке Т-четных фагов достаточно большим для прохождения через него одной или двух двойных спиралей ДНК? Объясните. Каков способ проникновения фаговой ДНК в клетку хозяина?

26.2. Какие преимущества при изучении фагов дает использование бактерий, растущих на твердой, а не жидкой среде?

26.3. Считаете ли Вы возможным изучение генетической основы различных белковых компонентов у фага? Объясните.

26.4. Что подразумевается под «скрещиванием» фагов? Каким образом можно установить, что скрещивание имело место?

26.5. Если в результате инфекции протопластов очищенной ДНК ФХ174 освобождается полноценное потомство фага, значит ли это, что

вся информация, необходимая для образования ДНК и белка фага ϕ X174, содержится в ДНК фага? Объясните.

26.6. Являются ли гипотезы о рекомбинации фагов, осуществляемой либо путем разрывов, либо путем ошибочного копирования, взаимоисключающими? Объясните.

26.7. В каких отношениях фаг λ подобен и в каких отличен от F-частицы?

26.8. Умеренный фаг способен трансдуцировать любой из известных хромосомных маркеров *E. coli*. Можно ли локализовать хромосомный участок его профага? Объясните.

26.9. Показано, что одна частица фага способна трансдуцировать бактериальный фрагмент, несущий не только бактериальный маркер, но и два сцепленных профага. Имеют ли эти данные какое-либо отношение к сущности всего фагового генома, осуществляющего инфекцию и (или) образование потомства фага? Объясните.

26.10. Как отличить мутант фага T4, несущий повреждение в *rII*-области, от мутанта, имеющего повреждение в *rI* или *rIII*-области?

26.11. Как можно использовать *цис-транс*-тест для определения функциональной комплементации между двумя мутантами фага?

26.12. Какое максимальное число нуклеотидов способен трансдуцировать фаг, еще сохраняющий способность функционировать в качестве фага? На чем основано Ваше предположение?

26.13. Если ген, контролирующий белок, содержит, в среднем, около 2000 нуклеотидов, сколько различных белков может контролировать фаг T4 и фаг ϕ X174?

26.14. Какое, по Вашему мнению, наиболее замечательное свойство фага ϕ X 174?

26.15. Мутанты, проявляющие функциональную комплементацию в области *ran-2* у *Neurospora*, могут быть расположены в одинаковом линейном порядке как с помощью комплементации, так и генетической рекомбинации. Обязательно ли обе карты должны быть идентичными и по другим областям? Объясните.

26.16. Что представляет собой функциональная генетическая единица, или цистрон? Какова длина этой единицы в нуклеотидах?

26.17. Какие сведения Вы получили в этой главе относительно химической протяженности генетических единиц рекомбинации и функции?

ЛИТЕРАТУРА

- S. Benzer. Fine Structure of a Genetic Region in Bacteriophage. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1955, 41, 344. Reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. S. Stent Ed.). Boston, 1960, p. 209.
- S. Benzer. The Elementary Units of Heredity, p. 70. In: «A Symposium on the Chemical Basis of Heredity», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). Baltimore, 1957. (С. Бензер. Элементарные единицы наследственности. — Сб. «Химические основы наследственности». М., ИЛ, 1960).
- S. Benzer. On the Topography of the Genetic Fine Structure. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 403.
- S. Benzer. The Fine Structure of the Gene. — Scient. Amer., 1962, 206, 70. (С. Бензер. Тонкая структура гена. — Сб. «Молекулярная генетика». М., ИЛ, 1963).
- S. Brenner, G. Streisinger, R. W. Horne, S. P. Champe, L. Barnett, S. Benzer, M. W. Rees. Structural Components of Bacteriophage. — J. Mol. Biol., 1959, 1, 281.
- P. F. Davidson, D. Freifelder, R. Hede, C. Levinthal. The Structural Unity of the DNA of T2 Bacteriophage. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 1123.
- A. H. Doermann, L. Bochner. An Experimental Analysis of Bacteriophage T4 Heterozygotes, I. — Virology, 1963, 21, 551.
- G. D. Guthrie, R. L. Sinsheimer. Observations on the Infection of Bacterial Protoplasts with the Deoxyribonucleic Acid of Bacteriophage X174. — Biochim. et biophys. acta, 1963, 72, 290.

H. Hanafy
Speci
1964,
W. Harm
by Ba
W. Hayes
Генет
D. R. Hel
Amino
A. D. Hers
Cold S
Bacter
A. D. Hers
Growth
Bacter
F. Jacob, E
cal Ba
(Ф. Ж
ские о
F. Jacob, E
A. D. Kaise
the Gen
509. Re
p. 353.
G. Kellenber
of Bact
R. Kilksn,
M. Meselson
tion in
G. Mosig. C
Fragmen
I. Rubenstein
phage D
U. S., 19
F. W. Stahl,
1964, 50
G. Streisinger
cularity

- H. Hanafusa, R. Hanafusa, H. Rubin. The Defectiveness of Rous Sarcoma Virus. II. Specification of RSV Antigenicity by Helper Virus.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 41.
- W. Harm, C. S. Rupert. Infection of Transformable Cells of *Haemophilus influenzae* by Bacteriophage and Bacteriophage DNA.— Z. Vererbungs., 1963, 94, 336.
- W. Hayes. The Genetics of Bacteria and Their Viruses. N. Y., 1964. (У. Хейс. Генетика бактерий и бактериофагов. М., изд-во «Мир», 1965).
- D. R. Helinski, C. Yanofsky. Correspondence Between Genetic Data and the Position of Amino Acid Alteration in a Protein.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 1962, 48, 173.
- A. D. Hershey, M. Chase. Genetic Recombination and Heterozygosis in Bacteriophage. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1951, 16, 471. Reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. S. Stent (Ed.). Boston, 1960, p. 179.
- A. D. Hershey, M. Chase. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage.— J. Gen. Physiol., 1952, 36, 39. Reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. S. Stent (Ed.). Boston, 1960, p. 87.
- F. Jacob, E. L. Wollman. Genetic Aspects of Lysogeny. In: «A Symposium on the Chemical Basis of Heredity», McElroy W. D. and B. Glass (Ed.). Baltimore, 1957, p. 468. (Ф. Жакоб, Э. Уолмен. Генетические аспекты лизогенности. —Сб. «Химические основы наследственности. М., ИЛ, 1960).
- F. Jacob, E. L. Wollman. Viruses and Genes.— Scient. Amer., 1961, 204, 92.
- A. D. Kaiser, F. Jacob. Recombination Between Related Temperate Bacteriophages and the Genetic Control of Immunity and Prophage Localization.— Virology, 1957, 4, 509. Reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. S. Stent (Ed.). Boston, 1960, p. 353.
- G. Kellenberger, M. L. Zichichi, J. J. Weigle. Exchange of DNA in the Recombination of Bacteriophage λ .— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 869.
- R. Kilkson, M. F. Maestra. Structure of T2 Bacteriophage.— Nature, 1962, 195, 494.
- M. Meselson, J. J. Weigle. Chromosome Breakage Accompanying Genetic Recombination in Bacteriophage.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 857.
- G. Mosig. Genetic Recombination in Bacteriophage T4 during Replication of DNA Fragments.— Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1964, 28, 35.
- I. Rubenstein, C. A. Thomas, Jr., A. D. Hershey. The Molecular Weights of T2 Bacteriophage DNA and its First and Second Breakage Products.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 1113.
- F. W. Stahl, R. S. Edgar, J. Steinberg. The Linkage Map of Bacteriophage T4.— Genetics, 1964, 50, 539.
- G. Streisinger, R. S. Edgar, G. H. Denhardt. Chromosome Structure in Phage T4. I. Circularity of the Linkage Map.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 775.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭПИСОМЫ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Локализация и генетические особенности фактора F определяют тип мужской скрещиваемости, встречающийся у *Escherichia*. У этих бактерий конъюгация ведет к образованию новых комбинаций при участии либо только хромосомных генов, либо внехромосомных эписомных генов, либо и тех и других одновременно.

Рассмотрим последовательность событий в генетической рекомбинации при участии фактора F. В случае, когда штамм *Hfr* ревертирует в F^+ , фактор F, включенный в хромосому *Hfr*, каким-то образом отделяется от нее, или *деинтегрируется*. Частица F-фактора выходит в цитоплазму, реплицируется и затем становится инфекционной. В последующих генерациях фактор F может снова оказаться включенным в хромосому, превратив ее снова в *Hfr*. Перед таким включением F-фактор, очевидно, спаривается с хромосомой, причем тяготение между F-фактором и хромосомой, вероятно, точно такое же, как между сегментом хромосомы донора и хромосомой реципиента при трансформации, конъюгации или трансдукции. При трансформации включающиеся локусы донора должны быть гомологичными локусам, замещаемым в клетке реципиента. (По всей видимости, такая гомология требуется также для включения хромосомных фрагментов, вводимых при конъюгации или трансдукции.) Так как фактор F может включаться в различные локусы, он, по-видимому, содержит сегменты ДНК, гомологичные многим хромосомным областям. Гомологичные сегменты, которые (как предполагается) содержат фактор F, либо существовали в «исходном» состоянии генома, либо могли возникнуть во время происходивших ранее деинтеграций. (Неизвестно, возник ли первый F-фактор из участка хромосомы или же он проник в бактериальную клетку извне.) Если свободная F-частица может содержать дополнительный сегмент хромосомной ДНК, полученный каким-то образом во время ее высвобождения из хромосомы, то в таком случае удастся найти такой тип свободного F-фактора, который при введении в F^- -штамм проявляет высокую степень сродства в отношении какой-то специфической хромосомной области. Напомним, что умеренные фаги, способные только к ограниченной трансдукции, проявляют такую специфичность, хотя частицы F дикого типа таковой не проявляют.

Рассмотрим результаты экспериментов Адельберга и Бернса (1960) и Жакоба и Адельберга (1959), имеющих отношение к упомянутому выше предположению. Штамм F^+ (несущий фактор F внехромосомно) дает начало штамму типа *Hfr*, *P4x*, хромосомные маркеры которого передаются в следующей последовательности: O (начало или ведущая точка) — *Pro* — *TL* — *Thi*..... — *Gal* — *Lac* — *SF* (место прикрепления полового фактора). Скрещивания $P4x \times F^-$ дают F^- -потомство, за исключением рекомбинантов *Lac* (которые оказываются обычно *Hfr*, поскольку F и *Lac* тесно сцеплены).

Из штамма *P4x* получен новый штамм, *P4x* — 1, имеющий следующие свойства:

1. Порядок передачи и время вхождения хромосомных маркеров (определяемые путем скрещиваний с прерыванием конъюгации) у этого штамма идентичны порядку и времени вхождения маркеров штамма *P4x*.

Так, оба штамма передают *Pro* примерно через 6 мин., *TL* — примерно через 12 мин. и последним передают *Lac*.

2. Реципиенты дают более низкую частоту рекомбинации в отношении хромосомных локусов при скрещивании с *P4x* — 1, чем при скрещивании с *P4x*, используемым в качестве донора. Например, частота образования рекомбинантов *Pro* составляла 0,3—0,5% при использовании в качестве донора штамма *P4x* — 1, тогда как при использовании в качестве донора *P4x* получено 4,8% *Pro* рекомбинантов.

3. В опытах с прерыванием конъюгации обнаружено, что многие *Pro* и *TL* рекомбинанты ведут себя как мужские штаммы.

4. Мужской фактор не был сцеплен ни с вышеупомянутыми локусами, ни с любым другим хромосомным маркером, участвующим в рекомбинации.

5. Подобно свободному F-фактору, мужской фактор входил в F⁻-клетку примерно через 5 мин. после начала конъюгации.

6. Обработка акридиновым оранжевым уничтожала мужской половой фактор, превращая клетки в F⁻. Эти данные свидетельствуют о том, что мужской половой фактор штамма *P4x* — 1, обозначенный как F', локализуется внехромосомно.

Фактор F может прикрепляться в различных участках хромосомы, что ведет к образованию *Hfr*-хромосом, отличающихся положением точки Ои направлением передачи. В отличие от F фактор F' прикрепляется в определенном локусе вблизи *Lac* таким образом, что хромосомные локусы всегда передаются в одном и том же порядке и направлении.

Поскольку *P4x* — 1 передает свою хромосому гораздо чаще, чем обычный F⁺ (F-содержащий) мужской штамм, то и вероятность связывания F' с хромосомой вблизи *Lac*, по-видимому, значительно больше, чем общая вероятность включения F-фактора в один из многочисленных локусов. С другой стороны, штамм *P4x* — 1 передает свою хромосому значительно реже, чем штамм *P4x*; это позволяет предполагать, что включение F в хромосому *P4x* — 1 оказывается неполным, в то время как у *P4x* он включается полностью. Этим отличием можно объяснить также тот факт, что штамм *P4x* — 1 содержит свободный F'-фактор, тогда как штамм *P4x* такового не содержит: ведь присутствие хромосомного F-фактора препятствует существованию в клетке свободного F-фактора. По-видимому, фактор F' существует обычно как своего рода экзогенот, спаривающаяся с хромосомой либо как раз перед началом конъюгации, либо сразу после ее начала. Механизм, который приводит к передаче хромосомы, включает, по-видимому, некое рекомбинационное событие между эписомой F' и хромосомой.

В тех случаях, когда F' передавался в клетки F⁻ как внехромосомная частица, клетки реципиента превращались в мужские, которые сравнительно часто оказывались способными передавать свои хромосомные маркеры в той же последовательности, как мужские штаммы *P4x* и *P4x* — 1; следовательно, хромосома обычной клетки F⁻ имеет вблизи *Lac* сегмент ДНК гомологичный сегменту, который несет F'; иными словами, F' обладает хромосомным сегментом, способным спариваться с определенным хромосомным локусом.

Как уже указывалось, обработка акридиновым оранжевым элиминирует внехромосомные частицы F' в штамме *P4x* — 1 и превращает его в F⁻-штамм. Такой F⁻-штамм конъюгирует с мужскими клетками, несущими внехромосомно либо F, либо F'. В обоих случаях штамм F⁻ сравнительно часто превращается в донора (мужской штамм), который передает свою хромосому в той же последовательности, что и *P4x* и *P4x* — 1. Совершенно очевидно, что F⁻-штамм, полученный из *P4x* — 1 в результате обработки его акридиновым оранжевым, несет хромосому, которая сохраняет сегмент F вблизи *Lac*, причем сохраняемый участок имеет нечто общее как с F⁻, так и с F'-факторами.

Если такая общность определяется F-участком частицы, то, следовательно, в этих экспериментах невозможно обнаружить различия между F и F'. Поскольку F'-частицы приблизительно вдвое крупнее F-частиц, можно думать, что F' представляет собой F-частицу с прикрепленным к ней дополнительным участком хромосомы.

Приведенные данные позволяют предполагать, что F'-частица способна нести хромосомную ДНК, по-видимому, еще сохраняющую способность к репликации в ее новом положении. Допустим, что такой хромосомный сегмент еще в состоянии нормально функционировать. F' может оказаться неспособным проявлять фенотипически эффект нормального хромосомного локуса из-за того, что он содержит один или более (что еще не определено) хромосомных маркеров. (Вероятно, идентифицировано менее 1% хромосомных локусов; кроме того, могут существовать хромосомные области, единственная функция которых — это сохранение эписом и рекомбинация с ними). Однако сам по себе факт существования частицы F' побуждает искать другие F-частицы, к которым могут быть прикреплены уже известные маркеры.

В скрещиваниях с прерыванием конъюгации клеток Lac^-F^- и штамма Lac^+Hfr , несущего F рядом с Lac^+ , выделены редкие рекомбинанты, которые получают Lac^+ слишком рано. Некоторые из этих рекомбинантов характеризуются следующими свойствами.

1. Они получают только F и Lac^+ .
2. Они отличаются нестабильностью и иногда выщепляют Lac^-F^- -особи; следовательно, исходный рекомбинант должен быть мерозиготой, несущей как Lac^+ , так и Lac^- -аллели.
3. При скрещивании с клетками Lac^-F^- они одновременно передают F и Lac^+ с частотой, равной или выше 50%. Такая передача наблюдается вскоре после начала конъюгации, как это происходит и в случае свободного F или F'-фактора и не зависит от передачи других хромосомных маркеров. Следовательно, F^-Lac^+ ведет себя как свободная отдельная частица.
4. Рекомбинанты передают свои хромосомы в той же последовательности, что и исходные Hfr -линии, однако с меньшей частотой (1/10). Частота передачи точно соответствует той, которая найдена при сравнении $P4x-1$ с $P4x$.
5. Частица F^-Lac^+ может быть передана в серии последовательных конъюгаций, причем каждый реципиент обладает свойствами первоначального рекомбинанта.

Все эти свойства проще всего объяснить тем, что F-частица несет хромосомный участок с маркером Lac^+ , полученным в исходном Hfr -штамме. Более того, установлено, что присоединившаяся Lac^+ -область содержит три цистрона, контролирующих синтез β -галактозидазы, синтез β -галактозид-пермеазы и образование репрессора для этой системы. В результате последовательных внедрений и высвобождений полового фактора из хромосомы можно получить также F^-Lac^- -частицы, состоящие из $F-Lac$ с точечной мутацией Lac^- . Наконец, было найдено, что другой штамм Hfr , содержащий интегрированный F около Pro , образует $F-Pro$ -частицы, свойства которых аналогичны свойствам частиц F^-Lac . Однако, если F^-Lac^+ -частица попадает в клетку, содержащую делецию в Lac -области, то частица, передающая Lac^+ , ведет себя подобно F-фактору в том отношении, что одновременно она передает случайные хромосомные маркеры с низкой частотой, характерной для обычных скрещиваний $F^+ \times F^-$.

Частица F может внедряться в различные локусы. Поэтому можно предположить, что при высвобождении ее из хромосомы какой-либо из многочисленных нормальных хромосомных локусов может стать частью генотипа цитоплазматического фактора F, сохраняя способность к репликации и функционированию во внехромосомном состоянии. Правильность этого предположения уже доказана.

Частицы типа F^+ и $F^- Lac$, получившие название *замещенных половых факторов*, представляют собой третий тип мужского полового фактора. Штаммы, содержащие их, характеризуются свойствами промежуточных доноров, способных передавать обычные хромосомные маркеры. Можно допустить, что F , F' и другие замещенные половые факторы обычно представляют собой небольшие кольцевые хромосомы из двуспиральной ДНК. Включение таких хромосом в хромосому *E. coli* в результате единичного кроссинговера могло бы привести к образованию большего (*Hfr*) кольца. В этом случае вновь включенный F -фактор может вызвать разрыв увеличенной кольцевой хромосомы (обычно в одном из концов F), обусловив этим подвижность хромосомы при конъюгации. Если хромосома замыкается в какой-то точке фактора F , то одна часть F должна находиться в точке O , а другая часть — на противоположном конце хромосомы. Существуют данные, позволяющие в некоторых случаях предполагать наличие такого типа разрыва. Фактор F способен высвободиться в результате внутреннего кроссинговера с образованием кольцевого F и кольцевой хромосомы *E. coli*. Следует, однако, подчеркнуть, что предлагаемая модель кольцевого F -фактора не основывается на каких-либо доказательствах.

В случае, когда F -фактор находится в клетке в деинтегрированном состоянии, на одну хромосому *E. coli* приходится одна или несколько F -частиц (по крайней мере в клетках, которые несут F в течение некоторого времени). (Этот случай напоминает другую ситуацию, когда организмы, содержащие более одной хромосомы, регулируют каким-то образом аналогичный процесс, так что каждая хромосома реплицируется только один раз в течение генерации.) Популяции доноров, выращенные до максимальной плотности в аэрируемом бульоне или культивируемые в течение ночи на агаре, могут временно утратить фенотип донора и вести себя как генетические реципиенты. Поскольку они еще сохраняют половой фактор, но ведут себя как F^- -клетки, они известны как *F^- -фенокопии* (см. стр. 331). В случае скрещивания *Lac F^- -фенокопии*, несущей F , с мужским штаммом F^+ , несущим $F^- Lac^+$, могут быть выделены эксконъюганты, которые несут оба типа F -факторов. Однако вскоре в потомстве обнаруживаются F -частицы только одного типа. Такое изменение показывает, что существует некая регуляция числа F -частиц, которое приходится на одну ядерную зону. Штамм *Hfr*, выполняющий роль F^- -фенокопии, не терпит присутствия введенного извне автономного полового фактора.

Фактор F не только обуславливает подвижность всей хромосомы в клетках *Hfr*, но, как показывает предыдущее обсуждение, способствует *переносу F -мерогенот*¹. Последний процесс также называют *сексдукцией*, *F -дукцией*, или *трансдукцией*, осуществляемой при участии полового фактора. При такого рода трансдукции замещенные половые факторы напоминают частицы λdg , подобно тому, как F напоминает λ . Можно получить гаплоидный штамм *Hfr*, содержащий два прикрепленных F -фактора, интегрированных таким образом, что при скрещивании хромосома представлена в виде двух фрагментов, составляющих $1/3$ и $2/3$ ее длины, с F -частичей в конце каждого из них, причем каждая из мерогенот может быть перенесена в F^- -клетку. F -мерогенот, несущая маркеры *Pur*, *V6* и *Lac*, передает мерогеноту таким образом, что порядок вхождения, определяемый при изучении спонтанного и искусственного прерывания скрещивания, оказывается $O - Pur - V6 - Lac - F$. Следовательно, во всех этих отношениях переносы хромосомы и мерогеноты, обуславливаемые F -факторами, по-видимому, одинаковы, с тем лишь отличием, что передаются различные по длине генетические сегменты.

¹ В этой части в дальнейшем использованы материалы работ А. Кларка и Е. Адельберга (1962), А. Кэмпбелла (1962) и В. Хейса (1964).

Маркеры мерогеноты способны иногда внедриться в хромосому: однако мерогеноты, сцепленные с F, могут также существовать и реплицироваться без интеграции, образуя клоны мерозигот или частичных диплоидов. Если мерогенота составляет не менее 4% от длины генома, то чем она длиннее, тем менее устойчива.

Внехромосомный половой фактор способен переходить из мужской клетки в женскую при конъюгации. Высвобождение и внедрение фактора F может привести к двустороннему обмену хромосомными генами между F и хромосомой в одной и той же клетке. Если фактор F прикреплен к некоему хромосомному локусу, то хромосомные гены приобретают подвижность и могут быть переданы в другую клетку. Фактор F может быть передан F⁻-клетке при трансдукции. При этом он сохраняется только в свободном состоянии, даже если донором был штамм *Hfr*. (Во время развития фага происходит фрагментация хромосомы по концам или вблизи от концов включенного F-фактора.) Следовательно, частица F непосредственно участвует в генетических рекомбинациях внутри бактериальной клетки и между бактериальными клетками: в этих рекомбинациях участвуют F-фактор как таковой и хромосомные гены.

ПРОМОТОРЫ

Промотор — это генетический элемент, обеспечивающий одно или несколько специальных условий, необходимых для осуществления генетического переноса при конъюгации. Если генетический элемент (подобный F) осуществляет все функции промотора, включая мобилизацию всей хромосомы или мерогеноты, то его называют *половым фактором*. Иногда промотор (например, F) обеспечивает только свой собственный перенос (в клетки F⁻). В других случаях промотор и вся хромосома или мерогенота передаются взаимосвязанно.

F-*Lac* стимулирует перенос как мерогеноты, так и хромосомы. После воздействия ультрафиолетовыми лучами на гетерогеноты F-*Lac* некоторые особи утрачивают способность к переносу *Lac* или хромосомных маркеров. Очевидно, мутация в F ведет к потере одной или нескольких функций промотора. При скрещивании *Salmonella* или *Shigella*, используемых в качестве реципиентов, с F⁺ или *Hfr E. coli*, фактор F передается; однако в некоторых случаях он не способен действовать в качестве полового фактора до тех пор, пока не будет перенесен обратно в F⁻ *E. coli*. Следовательно, функции промотора могут быть временно подавлены или не выражены в зависимости от генотипа реципиента.

ФАКТОРЫ ПЕРЕДАЧИ УСТОЙЧИВОСТИ

У *Shigella* обнаружен генетический фактор, *фактор передачи устойчивости*, или RTF (от англ. resistance transfer factor) (T. Watanabe, 1963). Фактор RTF — это промотор, который обуславливает конъюгацию и передачу серии различных сцеплений генов, контролирующих лекарственную устойчивость; следовательно, он представляет собой половой фактор. В особых условиях RTF способствует передаче хромосомных локусов. Он может быть передан от *Shigella* к *Escherichia* или к *Salmonella* независимо от хромосомы; такие реципиенты могут быть излечены от RTF с помощью акридиновых красителей. RTF стимулирует свой собственный перенос, который начинается примерно через минуту после смешивания родительских штаммов и реплицируется в клетке автономно. RTF сохраняет способность к переносу, попадая в F⁺ или *Hfr*-клетку, однако стимулируемый фактором F перенос хромосомы *Hfr*-клетки уменьшается в 100 раз, а перенос мерогеноты и свободного фактора F полностью подавляется определенными RTF-факторами. При спонтанной утрате RTF функции

F-фактора : останавливаются. Другие штаммы, несущие RTF, не влияют на функцию F-фактора.

F-фактор определяет образование антигена на поверхности клетки, который необходим для фага $\phi 2$, повреждающего мужские клетки. Если в клетке присутствуют оба фактора, RTF и F, то F-антиген замещается новым RTF-антигеном. В тех случаях, когда клетка инфицирована RTF, ее хромосомные маркеры передаются в 100 раз чаще, когда в хромосоме присутствует фактор F, чем когда его нет. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что между RTF и F существует, по крайней мере, частичная гомология. На основании этих и других данных можно заключить, что RTF имеет какое-то отношение к хромосоме, хотя и неспособен стабильно внедриться в нее. Исследователи, открывшие фактор RTF, назвали его эписомой.

КОЛИЦИНОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ

Работы Фредерика (1963) и Хейса (1964) показали, что многие штаммы кишечных бактерий (например, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) образуют одно или несколько высокоспецифичных антибиотических веществ, названных *колицинами*. Колицины обладают бактерицидным, но не бактериолитическим, действием; одна тысячная микрограмма колицина способна убить миллион чувствительных клеток *E. coli*. Известно более 12 групп колицинов; каждая группа обозначена одной из заглавных букв; каждая адсорбируется на различных рецепторных участках клеточной поверхности. Колицины, принадлежащие к одной и той же группе, могут различаться по ряду признаков. Колицины имеют высокий молекулярный вес; два из них, колицин K и колицин V, очищены и идентифицированы как липопротеиды. По-видимому, такие очищенные колицины идентичны O-антигену бактерий (W. Goebel, 1962). Молекула антигена может быть разделена на углеводно-липидную и белковую фракции, причем вся активность, присущая колицину, содержится в последней фракции.

Клетки, способные образовывать колицин, называют *колициногенными*, а клетки, не обладающие таким свойством, — *неколициногенными*. Колициногенность — это устойчивый признак, который может передаваться на протяжении многих тысяч клеточных генераций. Хотя клетка может спонтанно утрачивать колициногенность, спонтанного приобретения этого свойства никогда не наблюдали. Поэтому представляется вероятным предположение, согласно которому колициногенные бактерии обладают генетическим материалом, *колициногенными факторами (col)*, контролирующими синтез различных колицинов. Эти факторы передаются потомству не только при вегетативном размножении. Новые штаммы способны приобрести колициногенность при бактериальной конъюгации или трансдукции, осуществляемой фагом.

В колициногенной культуре лишь небольшая часть бактерий действительно образует колицины. Колицин оказывается летальным для бактерии, синтезирующей его, однако колициногенные клетки, не образующие колицина, жизнеспособны и иммунны к воздействию соответствующего колицина. Синтез колицина можно индуцировать почти во всех клетках колициногенной культуры ультрафиолетовыми лучами, азотным аналогом горчичного газа или перекисью водорода. Следовательно, по ряду упомянутых свойств колициногенность не отличается от лизогении и *col*-факторы ведут себя в этом отношении подобно профагам умеренного фага. В штамме, одновременно лизогенном и колициногенном, индукция часто ведет к освобождению либо фага, либо колицина, но не обоих факторов сразу.

Бактерии могут быть защищены от действия колицинов благодаря иммунитету, или устойчивости. Колициногенная бактериальная клетка

обладает рецепторными участками, которые, несмотря на то, что она иммунна к действию соответствующего колицина, делают ее чувствительной к действию колицинов других групп. Ряд генов сообщают клетке устойчивость к действию колицинов всех групп за счет утраты подобных рецепторов.

Как указывалось выше, колицин К и антиген О, по-видимому, идентичны. При изучении рецепторных участков для колицинов и вирулентных фагов найдено, что в ряде случаев колицины и фаги имеют общие рецепторные участки; таковы рецепторные участки для колицина К и фага Т6; для колицина Е и фага ВF-23; для колицина С и фагов Т1 или Т5. Вирулентный фаг прикрепляется к рецепторам с помощью белка, локализованного в кончике хвоста; по-видимому, колицин и белок кончика хвоста фага представляют собой очень близкие соединения. Однако при проведении серологических исследований не было обнаружено каких-либо перекрестных реакций между колицином и фагом, имеющими общий рецепторный участок. Кроме того, колициногенность не обеспечивает клетке иммунитета к инфекции фагом, прикрепляющимся к тому же участку. Если бактерии обработать белковыми оболочками (тенями) фаговых частиц Т2 фага, то все белковые синтезы в клетке (а возможно, что и синтезы РНК и ДНК) останавливаются. Тот же эффект вызывают колицины. Однако бактериальные клетки могут восстанавливать свои свойства, утраченные в результате обработки фаговыми тенями или колицином (если последние удалены ферментативным перевариванием). Иногда вирулентный фаг способен убивать бактериальную клетку, не репродуцируясь; в таких случаях компонентом, ответственным за летальный исход, оказывается белок кончика хвоста. В случае фага Т6 летальный белок имеет ту же кривую инактивации рентгеновыми лучами, ту же специфичность и тот же рецепторный участок, что и колицин К.

Поскольку летальный белок фага Т6 весьма напоминает по своим свойствам колицин К, то очевидно, что Т6 и *col* К гомологичны, по крайней мере, в отношении одного гена. Можно думать, что *col* К представляет собой вирулентный фаг, утративший ту часть генома, которая необходима для лизиса клетки и для образования частиц, инфекционность которых не зависит от конъюгации, но еще сохранивший часть фагового генома, достаточную для того, чтобы сделать клетку колициногенной. Эксперименты с использованием метки показывают, что три изученных *col*-фактора содержат ДНК в количестве 4×10^4 — 7×10^4 нуклеотидных пар, т. е. примерно $1/10$ от количества нуклеотидов, содержащихся в F-факторе или фаге.

Во время конъюгации клетки *E. coli* F⁺ передают фактор *col* E1 с высокой частотой, что свидетельствует об автономном существовании *col* E1. Автономные *col*-факторы попадают в F⁺-клетку примерно через 2 1/2 мин. после начала конъюгации. Так как штамм *Hfr E. coli*, несущий *col* V, *col* I или *col* E2, не передает их сцепленно, следовательно, эти *col*-факторы, по-видимому, несоединены друг с другом. У сальмонелл фактор *col* I передается при конъюгации в отсутствие F-фактора. Клетки, несущие только *col* E1, неспособны передавать его при конъюгации; однако клетки, инфицированные также *col* I, передают оба *col*-фактора. Следовательно, *col* I способствует передаче *col* E1. Если сальмонелла несет только фактор *col* I, то в ряде случаев наблюдается передача хромосомы при конъюгации. При инфицировании таких клеток фактором *col* E1 перенос хромосомы возрастает в 100 раз. Следовательно, у сальмонелл фактор *col* I способствует передаче фактора *col* E1, а *col* E1 обеспечивает передачу хромосомы. Это свидетельствует о том, что *col* I служит половым фактором. Акридиновые красители подавляют передачу *col*-факторов, хотя и не излечивают от колициногенности.

При скрещивании F⁺*col*⁻ с F⁻*col* I фактор F передается в F⁻*col* I-клетку, тогда как фактор *col* I передается с высокой эффективностью клеткам F⁺

col⁻. Если с низкой родител. При фагов (Е и *col* есть более о взаимос. эпизомн

ЗАКЛЮЧ

Между роппий несет св типичес

F', д себя под

Факт и умерен цины, С Возмож ры эвол

Неко переносу *col* I спо передаче лекарст ные фун вызываю

ВОПРОС

- 27.1. генотипа
- 27.2. и сегмен
- 27.3. устройс
- 27.4. зованию
- 27.5. (пролин
- 27.6.
- 27.7. вызвать
- 27.8. ется в способн
- ни из д
- данные?
- 27.9. ванного
- дает каж
- 27.10. ных про
- ды Вы
- фаге и

col⁻. Если же скрещивают *F*⁺ *col*I с *F*⁻*col*⁻, то фактор *col*I передается с низкой частотой, так как фактор *F* препятствует переносу *col*I от того же родительского штамма.

Приведенные данные показывают, что у умеренных и вирулентных фагов (E. Seaman, E. Targi, I. Margit, 1964), *F*-факторов, факторов RTF и *col* есть немало общих черт. Однако сейчас еще преждевременно делать более определенные выводы, касающиеся точной природы эволюционной взаимосвязи (если таковая вообще существует) между различными типами эпизомных элементов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Между внехромосомным фактором *F* и хромосомой наблюдается двусторонний обмен генетическим материалом. Хромосомные маркеры, которые несет свободный фактор *F*, сохраняют способность к репликации и фенотипическому выражению.

F['], другие *F*-мерогеноты, факторы RTF и некоторые *col*-факторы ведут себя подобно эписомам.

Факторы колициногенности по ряду свойств напоминают фактор *F* и умеренный фаг, находящийся в стадии провируса. Их продукты, колицины, близки летальному белку кончика хвоста вирулентных фагов. Возможно, что *F*-фактор, умеренный и вирулентный фаги и *col*-структуры эволюционно взаимосвязаны.

Некоторые эписомы бактерий способствуют своему переносу и (или) переносу другого генетического материала при конъюгации. У сальмонелл *col* I способствует передаче *col* E1, который, в свою очередь, способствует передаче хромосомы. RTF способствует передаче сцепленных маркеров лекарственной устойчивости и может подавлять определенные промоторные функции *F*-фактора. *F*-фактор и его производные, а также *col* I и RTF вызывают начало конъюгации и поэтому относятся к половым факторам.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

27.1. Происходит ли при скрещиваниях перенос *F*-частиц одного генотипа или разных генотипов? Объясните.

27.2. Обсудите взаимосвязь между переносом свободных *F*-частиц и сегмента мужской хромосомы.

27.3. Обсудите сущность бактериальной «хромосомы» и ее линейного устройства.

27.4. Какая цепь событий может, по Вашему мнению, привести к образованию штамма *P4x-1* из *P4x*?

27.5. Из какого именно штамма *Hfr E. coli* можно получить *F* — *Pro* (пролин) мерогеноту? Каким образом?

27.6. Каково, по Вашему мнению, происхождение эписомы?

27.7. Способны ли обычно внедрившиеся эписомы или их производные вызвать разрыв хромосом? Объясните.

27.8. Найдено, что фаг *P2* — умеренный фаг, который обычно включается в определенный хромосомный локус (положение I), — утрачивает способность предпочтительно включаться в положение I при высвобождении из штамма, несущего его в положении II. Как можно объяснить эти данные?

27.9. Обсудите утверждение: «Способностью переходить из интегрированного в свободное состояние (и из свободного в интегрированное) обладает каждый ген бактериальной клетки».

27.10. Некий трансдуцирующий фаг способен нести два тесно сцепленных профага, полученных из вдвойне лизогенного штамма. Какие выводы Вы можете сделать в отношении содержания нуклеотидов в зрелом фаге и в профаге?

27.11. Ген *Lac* может быть либо хромосомным (если он интегрирован в хромосому), либо внехромосомным (если он прикреплен к свободному F). Следует ли считать такой ген эписомой? Почему?

27.12. Как определить местоположение профага 434, индуцируемого ультрафиолетовыми лучами, на карте сцепления *E. coli*?

27.13. Как определить местоположение неиндуцируемого (ультрафиолетовыми лучами или образованием зиготы) фага?

27.14. Дегидрогеназа молочной кислоты содержит одновитчатый компонент примерно из 33 дезоксириботидов. Следует ли рассматривать эту часть фермента как генетический материал? Объясните.

27.15. Сообщалось, что при конъюгации F-фактор повышает способность к передаче в F⁻-клетку таких веществ, как лактоза, λ -репрессор и веществ, возникающих под действием ультрафиолетовых лучей и индуцирующих λ -профаг. Действует ли в этих случаях F как промотор? Объясните.

ЛИТЕРАТУРА

- E. A. Adelberg, S. N. Burns. Genetic Variation in the Sex Factor of *Escherichia coli*.— J. Bacteriol., 1960, 79, 321. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (ed.). Boston, 1960, p. 353.
- A. M. Campbell. Episomes. Advances Genetics, 1962, 11, 101.
- A. J. Clark, E. A. Adelberg. Bacterial Conjugation.— Annual Rev. Microbiol., 1962, 16, 289.
- P. Fredericq. On the Nature of Colicinogenic Factors: A. Review.— J. Theoret. Biol., 1963, 4, 159.
- W. F. Goebel. The Chromatographic Fractionation of Colicine K.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 214.
- W. Hayes. The Genetics of Bacteria and Their Viruses. N. Y., 1964. (У. Хейс. Генетика бактерий и бактериофагов. М., изд-во «Мир», 1965).
- F. Jacob, E. L. Wollman. In. «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 398.
- R. Maas. Exclusion of an F Lac Episome by an *Hfr* Gene.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 1051.
- E. Seaman, E. Tarmy, J. Marmur. Inducible Phages of *Bacillus subtilis*.— Biochemistry, 1964, 3, 607.
- T. Watanabe. Infections Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria.— Bacteriol. Revs., 1963, 27, 87.

В предд
ДНК. Р
не содер
протеин
животн
многие
и желто
(f2, MS
heimer,
идентич
вес; обл
логичес
или F⁺)
Обыч
Этот ви
окружев
оболочк
липидов
от того,
образует
он покид
должае
щихся Р
жизнеде
са. Если
Д, то мо
того, на
в цитопл
в цитопл
му весьм
РНК и б
антигено
Удало
рые отли
и MEL (с
множеств
инфекция
не только
ных типо
рекомбин
поскольк
на работе
показана
биация у
или более
тная РНК
(G. H. Ni

РНК КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

В предыдущих главах подробно говорилось только о фагах, содержащих ДНК. В этой главе мы рассматриваем другую группу вирусов, которые не содержат ДНК и целиком или главным образом состоят из рибонуклеопротеина. К этой группе относятся многие мелкие вирусы, заражающие животных (например, вызывающие полиомиелит, грипп и энцефалит), многие вирусы, заражающие растения (такие, как вирус табачной мозаики и желтой мозаики турнепса) и мелкие бактериофаги, содержащие РНК (*J2*, *MS2*, *R17* и другие) (T. Loeb a. N. Zinder, 1961; J. Davis a. R. Sinsheimer, 1963; S. Mitra и др., 1963). Все эти фаги очень сходны, но не идентичны. Они имеют одинаковые размеры, форму и молекулярный вес; обладая одинаковыми белками оболочки, дают перекрестные серологические реакции; все они инфицируют только мужские клетки (*Hfr* или *F⁺*) *E. coli*.

Обычным хозяином вируса гриппа является клетка млекопитающих. Этот вирус состоит из спиральной рибонуклеопротеидной сердцевинки, окруженной липопротеидной оболочкой. Было показано, что липиды оболочки вируса гриппа образуются главным образом из предсуществующих липидов клетки хозяина, причем состав липидов изменяется в зависимости от того, какая линия клеток служит хозяином. Наружная оболочка вируса образуется, очевидно, из клеточной оболочки и окружает вирус, когда он покидает клетку. После внедрения вируса нормальный рост клеток продолжается несколько часов. Следовательно, большая часть синтезирующихся РНК, белка и ДНК представляет собой нормальные продукты жизнедеятельности клетки, образование которых не связано с ростом вируса. Если подавить синтез клеточной РНК с помощью яда — актиномицина Д, то можно обнаружить специфический синтез вирусной РНК. Кроме того, на примере сходного вируса болезни Ньюкасла, который растет в цитоплазме, можно показать, что новая (вирусная) РНК появляется в цитоплазме, а не в ядре, как это имеет место в нормальной клетке. Поэтому весьма вероятно, что внутри клетки вирус управляет образованием РНК и белка, входящих в состав вируса, а также и других вирусных антигенов — таких, как гемагглютинирующие факторы.

Удалось выделить несколько гаплоидных линий вируса гриппа, которые отличались генетически; например, линию SWE (с маркерами *ac*) и MEL (с маркерами *AC*). Когда использовали смесь обеих линий для множественного заражения оболочек куриного зародыша, то смешанная инфекция давала в потомстве вирусные частицы, образующие чистые клоны не только родительских генотипов, но также и стабильных рекомбинантных типов (*Ac* или *aC*). Эти результаты доказывают, что генетическая рекомбинация происходит также и между вирусами, содержащими РНК, поскольку другие объяснения можно исключить. Этот вывод основан на работе Ф. Бернета и других. Генетическая рекомбинация была также показана и для вируса полиомиелита. В то время как генетическая рекомбинация у вируса гриппа может происходить в результате включения двух или более единиц вирусной РНК в одну вирусную частицу, рекомбинантная РНК полиовируса, по-видимому, представлена одной молекулой (G. H. Hirst, 1962). Следовательно, несмотря на то что детали процесса

рекомбинации между вирусами, содержащими РНК, неизвестны, можно предполагать, что не существует единого механизма рекомбинации.

Пока еще не было получено данных о существовании генетической рекомбинации у вирусов растений. Заражение *вирусом табачной мозаики* (ВТМ) в экспериментальных условиях получают при растирании препарата вируса на поверхности листа. Даже при использовании высокой концентрации вируса только небольшая часть вирусных частиц ($1:10^6$) находит чувствительные клетки и проникает в них, приводя к заметным повреждениям. По этой причине в клетке табака трудно получить множественную инфекцию, и отрицательные результаты при исследовании генетической рекомбинации получаются, вероятно, из-за отсутствия смешанных заражений.

Частица ВТМ представляет собой цилиндр высотой 3000 Å, с радиусом около 80 Å (рис. 28—1, верхний). Ее молекулярный вес около 40×10^6 , причем 38×10^6 приходится на белок, а 2×10^6 — на РНК. Размеры ВТМ определяются спиральной агрегацией около 2200 идентичных белковых субъединиц, каждая из которых имеет молекулярный вес около 18 000 и содержит 158 аминокислот в одной полипептидной цепи (рис. 28—2). На поперечном срезе частицы ВТМ видна полая сердцевина с радиусом примерно 20 Å (рис. 28—1, справа); следовательно, белковая субъединица добавляет к радиусу еще около 60 Å. РНК в вирусной частице представлена (рис. 28—1, нижний) одним характерным неразветвленным тяжем, содержащим около 6400 нуклеотидов. Этот тяж образует спираль радиусом 40 Å, протянутую через белковые субъединицы. Изнутри РНК обычно покрыта слоем белковых субъединиц толщиной примерно в 20 Å, а толщина белкового слоя снаружи 40 Å. Поскольку белковые субъединицы организованы в неплотно закрученную спираль (49 субъединиц в 3 витках), то такую же спираль образует и РНК.

Если суспензию ВТМ в воде обработать фенолом, то белок вируса экстрагируется в фенол, а в воде остается интактная целая молекула РНК. Если листья табака обработать РНК, с которой снят таким способом белок, то частота заражения уменьшается в 500 раз по сравнению с частотой при заражении эквивалентным числом целых вирусных частиц; при этом получается типичное потомство ВТМ (законченные частицы с белковыми оболочками, характерными для ВТМ). Повторные обработки фенолом более не снижают инфекционности РНК, и в препаратах нельзя обнару-

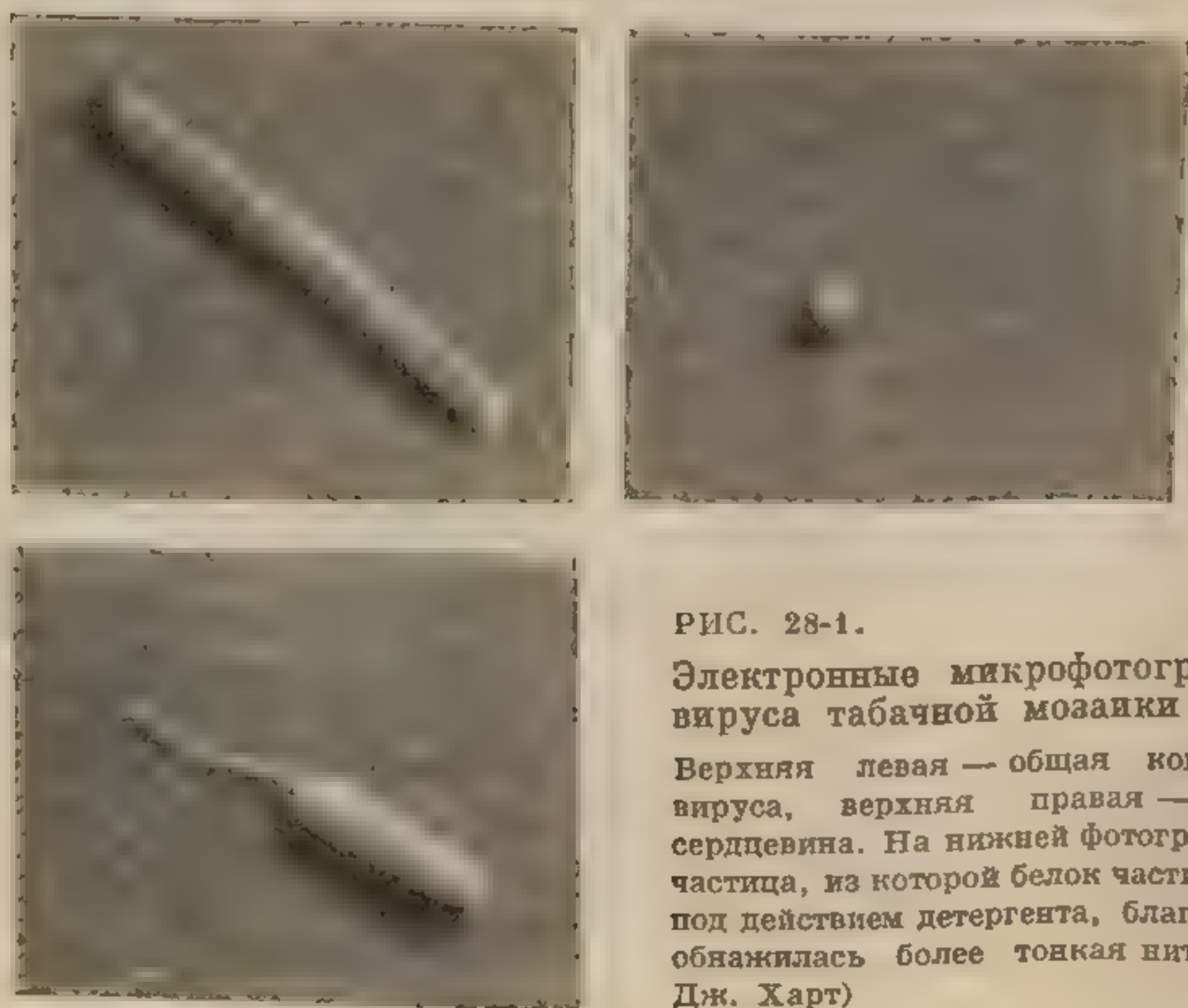


РИС. 28-1.

Электронные микрофотографии вируса табачной мозаики (ВТМ).

Верхняя левая — общая конфигурация вируса, верхняя правая — его полая сердцевина. На нижней фотографии видна частица, из которой белок частично удален под действием детергента, благодаря чему обнажилась более тонкая нить РНК (Р. Дж. Харт)

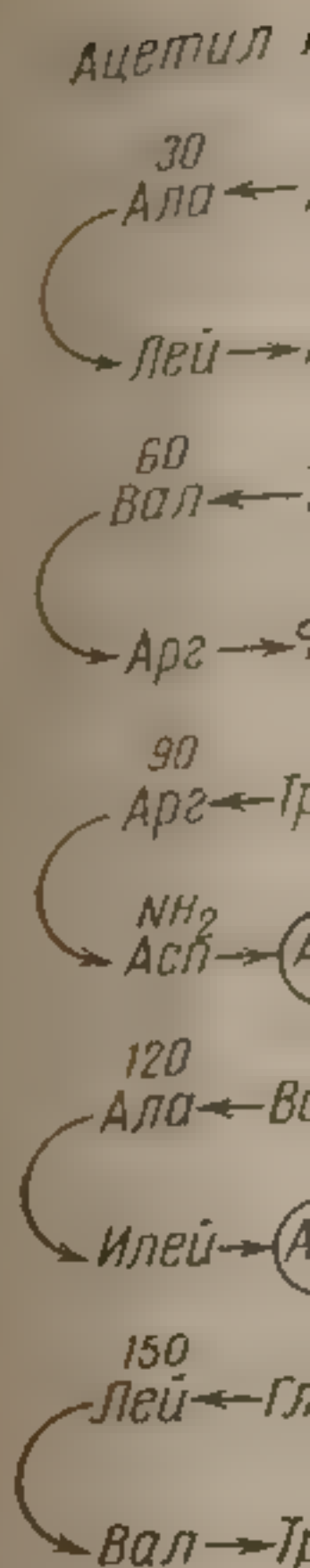


РИС. 28-2.

Аминокисл
мозаики (I
В субъедини
трипсином

жить бел
ность фр
можно з
генетичес
также до
риала (Р
и увелич
ми опыта
сначала р
высокую
щиеся ген
rib grass
вирус, со
ченное по
оболочка
вирус с Н
белком и
специфику
индуциров
ношении
тивность
вторичной

¹ РНК, выд
также ин
1962; Д. Б
² Описание
кель-Конра

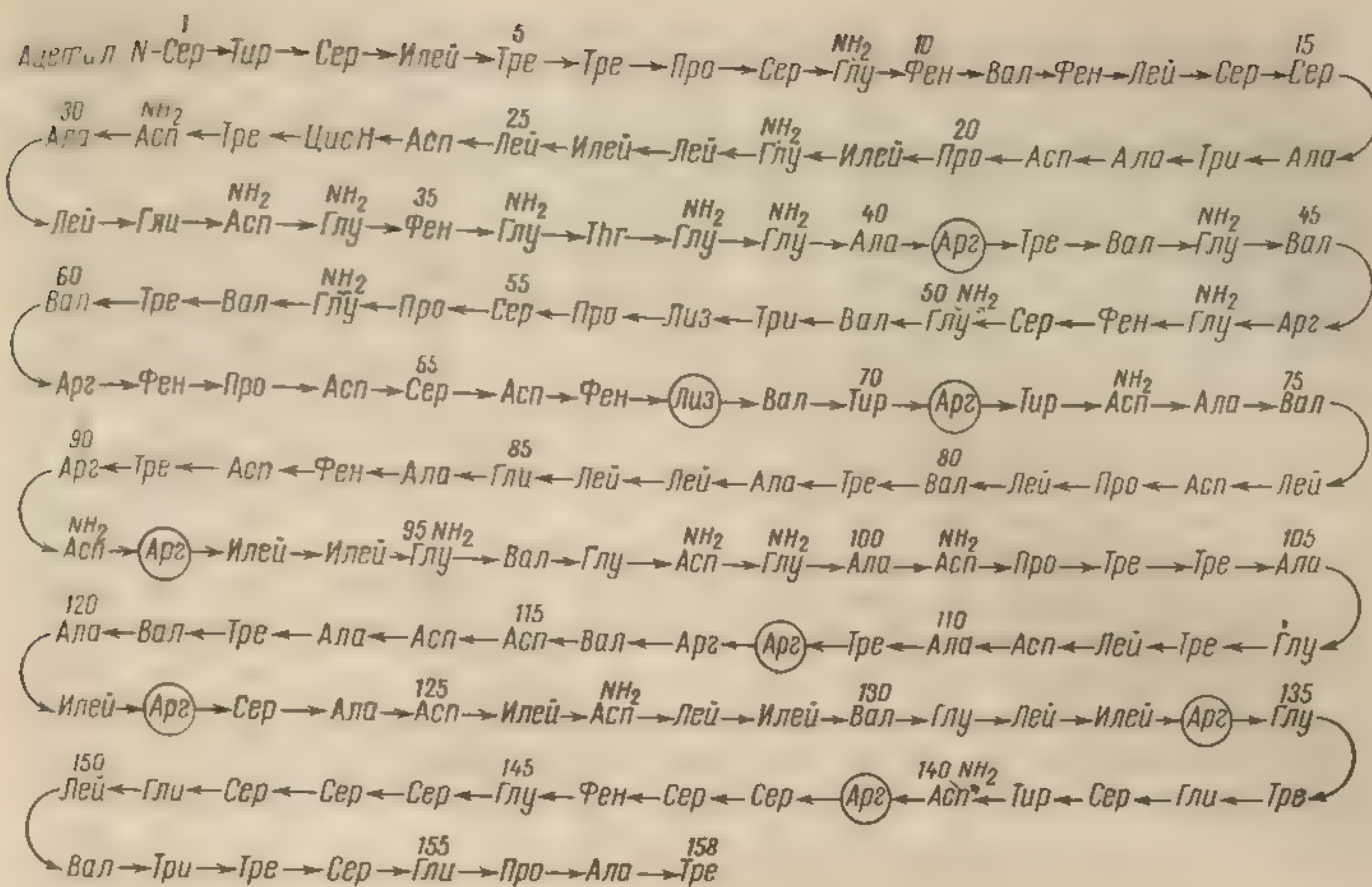


РИС. 28-2.

Аминокислотная последовательность в белковом строительном блоке вируса табачной мозаики (ВТМ).

В субъединице содержится 158 аминокислотных остатков; кружки указывают места переваривания трипсином

жить белка. С другой стороны, РНКаза полностью разрушает инфекционность фракции РНК, не влияя на инфекционность целого вируса. Поэтому можно заключить, что чистая вирусная РНК инфекционна и несет всю генетическую информацию, необходимую для ее репликации¹. Эти опыты также доказывают, что белок ВТМ при репликации генетического материала (РНК) и самого белка играет только одну роль — защищает РНК и увеличивает инфекционность. Этот вывод был проверен так называемыми опытами по реконструкции, где в определенных условиях мы можем сначала разделить белок и РНК ВТМ, затем их воссоединить и показать высокую инфекционность полученного вируса. Если взять два различающиеся генетически штамма этого вируса — стандартный (ВТМ) и Holmes rib grass (HR), то можно реконструировать высоко инфекционный вирус, содержащий РНК ВТМ и белковую оболочку вируса HR. Полученное потомство представлено типичным ВТМ, причем и РНК, и белковая оболочка вируса характерны для ВТМ. При реципрокной реконструкции вирус с HR-РНК и белком ВТМ дает HR-потомство с типичным для него белком и РНК. Таким образом в частице ВТМ только РНК определяет специфику РНК и белка потомства вируса². Мутации ВТМ могут быть индуцированы многими агентами, которые известны как мутагены в отношении ДНК. Эти и другие факты доказывают, что биологическая активность РНК зависит от ее первичной (нуклеотидный состав), а не от вторичной (характер спирализации) структуры.

¹ РНК, выделенная из ряда мелких вирусов животных и колифагов f2, MS2 и т. п., также инфекционна (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, v. 27, 1962; D. Engelhardt and N. Zinder. Virology, 1964, 23, p. 582—587).

² Описание генетических опытов с ВТМ основано главным образом на работах Г. Френкель-Коврата и Р. Ц. Вильямса (1955), А. Гирера (1960) и других.

Известна полная аминокислотная последовательность строительного белкового блока ВТМ (рис. 28—2); значительно меньше известно о последовательности рибонуклеотидов в ВТМ. Можно рассматривать ВТМ как полимер из 3'-моонуклеотидов, концевым нуклеозидом которого является аденозин (В. Singer и Н. Fraenkel-Conrat, 1961).

Фосфодиэстераза змеиного яда (см. главу 21) отщепляет 5'-нуклеотиды по одному, начиная со свободного 3'-ОН конца РНК ВТМ, называемого 3', или нуклеозидным концом, благодаря чему можно обнаружить, что терминальная последовательность оснований представлена последовательностью: УАЦУА (или, возможно, УАУЦА). Седиментационные свойства РНК ВТМ, из которой ферментативно удалены 1—3 нуклеотида, не изменяются, т. е. фермент прежде всего действует с конца молекулы РНК, подобно экзонуклеазе.

Внутренняя целостность молекулы также доказывается тем, что такая лишенная терминального конца РНК ВТМ инфекционна и дает потомство ВТМ. Когда потомство ВТМ, в свою очередь, обрабатывается той же диэстеразой, то сначала отщепляется А, затем У и далее Ц. Таким образом, когда реплицируется РНК, из которой, по-видимому, было удалено несколько терминальных нуклеотидов, то в потомстве восстанавливается изначальная нуклеотидная последовательность (В. Singer и Н. Fraenkel-Conrat, 1963). Возможно, что такая последовательность встречается в потомстве случайно; возможно также, что свободный 5'-ОН конец, называемый 5'-, или нуклеотидным концом, может в норме спариваться основаниями на некотором расстоянии с 3'-концом ВТМ. Если диэстераза удаляет терминальный ...ЦУА конец, то укороченный 3'-конец может быть восстановлен путем образования последовательности, комплементарной УАГ..., с которой, как мы предполагаем, начинается 5'-конец. С другой стороны, кажется более вероятным, что инфекционность этих деградированных РНК, составляющая 10% от нормы, связана с оставшимися недеградированными молекулами РНК, которые, конечно, инфицируют совершенно нормально. Очень возможно, что деградация под влиянием диэстеразы змеиного яда не идет синхронно, так что от одних молекул нуклеотиды могут отщепляться раньше, чем от других.

Результаты, полученные с ВТМ и другими вирусами, содержащими РНК, показывают, что в процессе репликации генетического материала (РНК) происходит образование комплементарной нити РНК. Была выделена и очищена зависящая от РНК РНК-полимераза, РНК-синтетаза, или РНК-репликаза, — фермент, использующий рибозидтрифосфаты и направляемый РНК при образовании комплементарной РНК¹. РНК-синтетаза использует однонитевую РНК фага фMS2, называемую нитью «плюс», как матрицу для синтеза *in vivo* комплементарной «минус»-РНК. Двунитчатый продукт, называемый репликативной формой, используется *in vitro* в качестве естественной матрицы для синтеза «плюс»-нитей с помощью той же или другой РНК-синтетазы (С. Weissmann и др., 1964). В этой связи следовало бы отметить, что инфекционные формы раневого вируса, полученные из сладкого клевера, и реовируса, связанного с дыхательным и пищевым трактами животных, включая человека, в качестве генетического материала имеют двунитчатую РНК (Р. Gomatos и I. Tamm, 1963).

¹ Согласно работам И. Гаруна, К. Нозу, И. Отака и С. Спигельмана (1963), а также К. Вейсмана, Л. Симона и С. Огоа (1963) и Д. Балтимора (1964).

РНК явля
вирусов. I
собностью
РНК, име
вируса ос
ментарных

ВОПРОСЫ

- 28-1. К
или около
около 50 0
белковых
- 28-2. И
определить
ВТМ?
- 28-3. С
- 28-4. Об
возникать
РНК.
- 28-5. Ка
ссылку на
ского фага
- 28-6. В
и РНК-син
- 28-7. Об
РНК по ср
зрелого вир

ЛИТЕРА

- D. Baltimore.
Proc. Nat
F. M. Burnet,
Plant and
J. E. Davis, P
Acid to P
J. T. Finch. P
Microscop
H. Fraenkel-Co
Advances
H. Fraenkel-Co
Inactive P
41, 690. I
Cliffs, N. J
A. Gierer. Rib
W. Hayes
P. J. Gomatos,
Nat. Acad
G. K. Hirst. G
Influenza.
R. W. Horne. T
W. R. Hudson,
Virus Infec
T. Loeb, N. D
U. S., 196

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РНК является единственным носителем генетических свойств у некоторых вирусов. Некоторые вирусы животных, содержащие РНК, обладают способностью к генетической рекомбинации. Зрелые вирусы, содержащие РНК, имеют либо однотяжную, либо двунитчатую РНК. Репликация РНК вируса осуществляется РНК-синтетазой с образованием цепей, комплементарных РНК.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

28-1. Какие выводы Вы можете сделать из наблюдения, что через день или около того после инфекции одной частицей ВТМ в клетке образуется около 50 000 молекул вирусной нуклеиновой кислоты и около 100×10^6 белковых субъединиц?

28-2. Используя для заражения чистую РНК ВТМ, как Вы можете определить, содержит ли эта РНК информацию для образования белка ВТМ?

28-3. Сравните трансформацию с заражением чистой вирусной РНК.

28-4. Обсудите точку зрения, согласно которой опухолевый рост может возникать в результате вирусной инфекции, активирующей репликацию РНК.

28-5. Какие выводы Вы можете сделать на основании наблюдения (см. ссылку на работу I. E. Davis and R. L. Sinsheimer, 1963), что РНК родительского фага MS2 обычно не входит в потомство фага?

28-6. В чем состоят сходство и различие в поведении ДНК-полимеразы и РНК-синтетазы?

28-7. Обсудите возможные преимущества и недостатки двунитчатой РНК по сравнению с однонитчатой в качестве генетического материала зрелого вируса.

ЛИТЕРАТУРА

- D. Baltimore. In Vitro Synthesis of Viral RNA by the Poliovirus RNA Polymerase.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 450.
- F. M. Burnet, W. M. Stanley (Eds). The Viruses; General Virology, 1959, v. 1, 609 p.; Plant and Animal Viruses, 1959, v. 2, 408 p.; Animal Viruses, 1959, v. 3, N. Y.
- J. E. Davis, R. L. Sinsheimer. The Replication of MS2.1. Transfer of Parental Nucleic Acid to Progeny Phage.— J. Mol. Biol., 1963, 6, 203.
- J. T. Finch. Resolution of the Substructure of Tobacco Mosaic Virus in the Electron Microscope.— J. Mol. Biol., 1964, 8, 872.
- H. Fraenkel-Conrat, L. K. Ramachandran. Structural Aspects of Tobacco Mosaic Virus.— Advances Protein Chem., 1959, 14, 175.
- H. Fraenkel-Conrat, R. C. Williams. Reconstitution of Tobacco Mosaic Virus from its Inactive Protein and Nucleic Acid Components.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1955, 41, 690. Reprinted in «Classic Papers in Genetics», J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall, 1959, p. 264.
- A. Gierer. Ribonucleic Acid as Genetic Material of Viruses. In: «Microbial Genetics» W. Hayes and R. C. Clowes (Eds.). Cambridge, 1960, p. 248.
- P. J. Gomatos, I. Tamm. Animal and Plant Viruses with Double-Helical RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 878.
- G. K. Hirst. Genetic Recombination with Newcastle Disease Virus, Polioviruses, and Influenza.— Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1962, 27, 303.
- R. W. Horne. The Structure of Viruses.— Scient. Amer., 1963, 208, 48, 170.
- W. R. Hudson, Y. T. Kim, R. A. Smith, S. G. Wildman. Synthesis of Tobacco Mosaic Virus Infectivity by Cell Free Extracts.— Biochim. et biophys. acta, 1963, 76, 257.
- T. Loeb, N. D. Zinder. A Bacteriophage Containing RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 282.

- S. Mitra, M. D. Enger, P. Kaesberg.* Physical and Chemical Properties of an RNA from the Bacterial Virus R17.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 68.
- K. K. Reddi.* Studies on the Formation of Tobacco Mosaic Virus Ribonucleic Acid. V. Presence of Tobacco Mosaic Virus in the Nucleus of the Host Cell.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 397.
- A. Richter.* Structure of Viral Nucleoproteins.— *Annual Rev. Microbiol.*, 1963, 17, 415.
- W. Shipp, R. Naselkorn.* Double-Stranded RNA from Tobacco Leaves Infected with TMV.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 401.
- B. Singer, H. Fraenkel-Conrat.* Studies of Nucleotide Sequences in TMV-RNA. I. Stepwise Use of Phosphodiesterase.— *Biochim. et biophys. acta*, 1963, 72, 534.
- A. Tsugita, D. T. Gish, J. Young, H. Fraenkel-Conrat, C. A. Knight, W. M. Stanley.* The Complete Amino Acid Sequence of the Protein of Tobacco Mosaic Virus.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1960, 46, 1463.
- C. Weissmann, P. Borst, R. H. Burdon, M. A. Bulleter, S. Ochoa.* Replication of Viral RNA, IV. Properties of RNA Synthetase and Enzymatic Synthesis of MS2 Phage RNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, 890.

Вир
множ
ядер
авто
гены
Ра
мута
для
матер
Ре
испол
обнар
ваемы
ских
ством,

ДРОЗО

Как
филы?
ческих
и тех
провер
иной
различ
ра, сд
(Соотв
довани
щая ча
зована
безусп
Теп
устойч
дикого
них вре
пользо
к CO₂
тельно,
хромос
чивойл
ются ч
дополни
передае
получе
ности к
такая л
дельном

ВНЕЯДЕРНЫЕ ГЕНЫ

Вirus оспы кролика, содержащий ДНК, и некоторые РНК-вирусы, размножение которых ограничено цитоплазмой клеток, обладающих четкой ядерной мембраной (а поэтому и характерным ядром), являются, очевидно, автономными внеядерными генами. Как часто встречаются внеядерные гены и какова их связь со специфическими хромосомными генами?

Различные экспериментальные тесты (химические, рекомбинационные, мутационные, фенотипические и репликативные) могут быть применены для идентификации внеядерного компонента в качестве генетического материала.

Рекомбинация была первым экспериментальным методом, который использовался для исследования внеядерных генов. Чтобы можно было обнаружить рекомбинацию, внеядерные гены должны давать распознаваемый фенотипический эффект. Для обеспечения требуемых фенотипических различий должны иметь место изменения, определяемые либо качеством, либо количеством (или тем и другим) такого гена.

ДРОЗОФИЛА

Как же мы фактически приступим к поискам внеядерного гена у дрозофилы? Начинают с исследования разных неперекрывающихся фенотипических различий, которые встречаются из поколения в поколение в одних и тех же условиях среды; ставят серии скрещиваний для того, чтобы проверить, связано ли существование различий с присутствием той или иной хромосомы (X, Y, II, III, IV). Если это так, то фенотипические различия являются, вероятно, эффектом некоторого генетического фактора, сцепленного с хромосомой и, следовательно, локализованного в ней. (Соответствующие дополнительные скрещивания и цитологические исследования покажут истинную природу изменения ядерного гена. Подавляющая часть тщательно проанализированных генетических свойств локализована в хромосомах; поэтому поиск внеядерных генов обычно бывает безуспешным.)

Теперь рассмотрим генетические различия у дрозофилы, связанные с *устойчивостью и чувствительностью к CO₂* (газу). Хотя взрослых мух дикого типа можно выдерживать в чистом CO₂ до 15 мин. без заметного для них вреда, мухи других линий в таких условиях почти всегда гибнут. Используя маркированные хромосомы, можно показать, что чувствительность к CO₂ не связана ни с одной из хромосом нормального генома. Действительно, с помощью определенных скрещиваний можно заменить каждую хромосому в чувствительной линии на соответствующую хромосому устойчивой линии. Но и после того, как это сделано, полученные мухи все еще остаются чувствительными к CO₂! Возможно, чувствительная линия несет дополнительную негомологичную ядерную хромосому, которую она передает независимо от обычных хромосом. Однако в потомстве гибридов, полученных от чувствительных и устойчивых линий, свойство чувствительности к CO₂ не выщепляется, что указывает на то, что если существует такая лишняя хромосома, то она не может существовать отдельно (в отдельном чувствительном гибриде) или в виде пары (у мух чистой чувстви-

тельной линии). Хотя цитологические исследования не обнаруживают дополнительной ядерной хромосомы, это не является решающим аргументом против существования ядерного локуса, определяющего чувствительность к CO_2 , так как, согласно данным по рекомбинации, существуют столь малые «хромосомы», которые не удастся обнаружить цитологически. (Фенотипическое изменение у кукурузы связано с присутствием легко обнаруживаемых лишних гетерохроматических хромосом «В»).

Хотя чувствительные самки всегда передают потомству чувствительность к CO_2 , чувствительные самцы делают это только в особых случаях. Возможно, ядерный ген, определяющий чувствительность, каким-то образом исключается из ядра, которое становится ядром сперматозоида, но остается в ядре, попадающем в яйцеклетку, хотя казалось бы более разумным скорее отнести неспособность передавать чувствительность к CO_2 через сперму за счет небольшого количества цитоплазмы в сперме сравнительно с количеством ее в яйцеклетке. Поэтому весьма вероятно, что чувствительность к CO_2 у дрозофилы обязана присутствию частиц, называемых *сигма-частицами*. Другие исследования показывают, что сигма-частица содержит ДНК (N. Plus, 1963), мутабельна и обладает многими свойствами вируса, включая экспериментально наблюдаемую инфекционность¹. Так как сигма-частицу не удастся увидеть, то ее локализация внутри клетки остается в какой-то степени покрытой тайной. Некоторые свойства сигма-частицы и эписомы оказываются сходными. В ряде случаев пигментные опухоли у дрозофилы могут также зависеть от присутствия частиц, сходных с эписомами (Varigozzi, 1963).

Рассмотрим другое свойство дрозофилы (глава 8): самки, спаренные с нормальными самцами, дают в потомстве почти исключительно самок. Это свойство имеет генетическую основу; оно не передается самцам, носит инфекционный характер и не сцеплено с обычными хромосомами; доказано, что оно непосредственно связано с присутствием в крови самок определенного вида спирохет.

КУКУРУЗА

Ни один из только что приведенных примеров окончательно не доказывает одновременного существования внутриядерных и внеядерных генов. Однако они служат иллюстрацией возможных результатов поиска таких генов в тех случаях, когда они начинаются с исследования генетической рекомбинации. Желательно показать прямую связь между внеядерными генами и структурами, видимыми в цитоплазме.

Продолжая поиск внеядерных генов, обратим внимание на цитоплазматические компоненты, которые кажутся нам сейчас нормальными компонентами клеток, оставив в стороне вопрос о том, обстоит ли так же дело, когда они или их предшественники впервые появились в клетках.

Многие растительные клетки содержат цитоплазматические тела, называемые *пластидами*. Зеленые пластиды (из-за присутствия хлорофилла) называют *хлоропластами*, а белые пластиды — *лейкопластами*. Незрелые пластиды мелкие и бесцветны. Без солнечного света хлоропласты теряют пигмент и становятся лейкопластами; этот процесс обратим, если пластиды опять подвергнутся действию солнечного света.

У кукурузы мутантные хромосомные гены могут влиять на цепь реакций, ведущих к образованию хлорофилла. Один такой ядерный ген полностью препятствует образованию в пластидах хлорофилла, так что образуются лейкопласты, которые не могут позеленеть. Проростки с соответствующим мутантным генотипом не будут зеленеть; они будут расти только

Исследованиями сигма-частицы очень много занимались Лэритье, Тесье и сотрудники.

РИС.

Марк
сметр
расте
задне
расте

до тех п
фотосин
ядерные
ствуют

Неко
и белым
позелене
ван ли з
листа р
ядерного
бы через
ткань —
органов.

Иног
так как
Если зер
жению в
белыми
типов; в
альбинос
полосато
впочатке
что спосо
отцовско
рой прив
вания по

¹ Нижесле

25 И. Герш

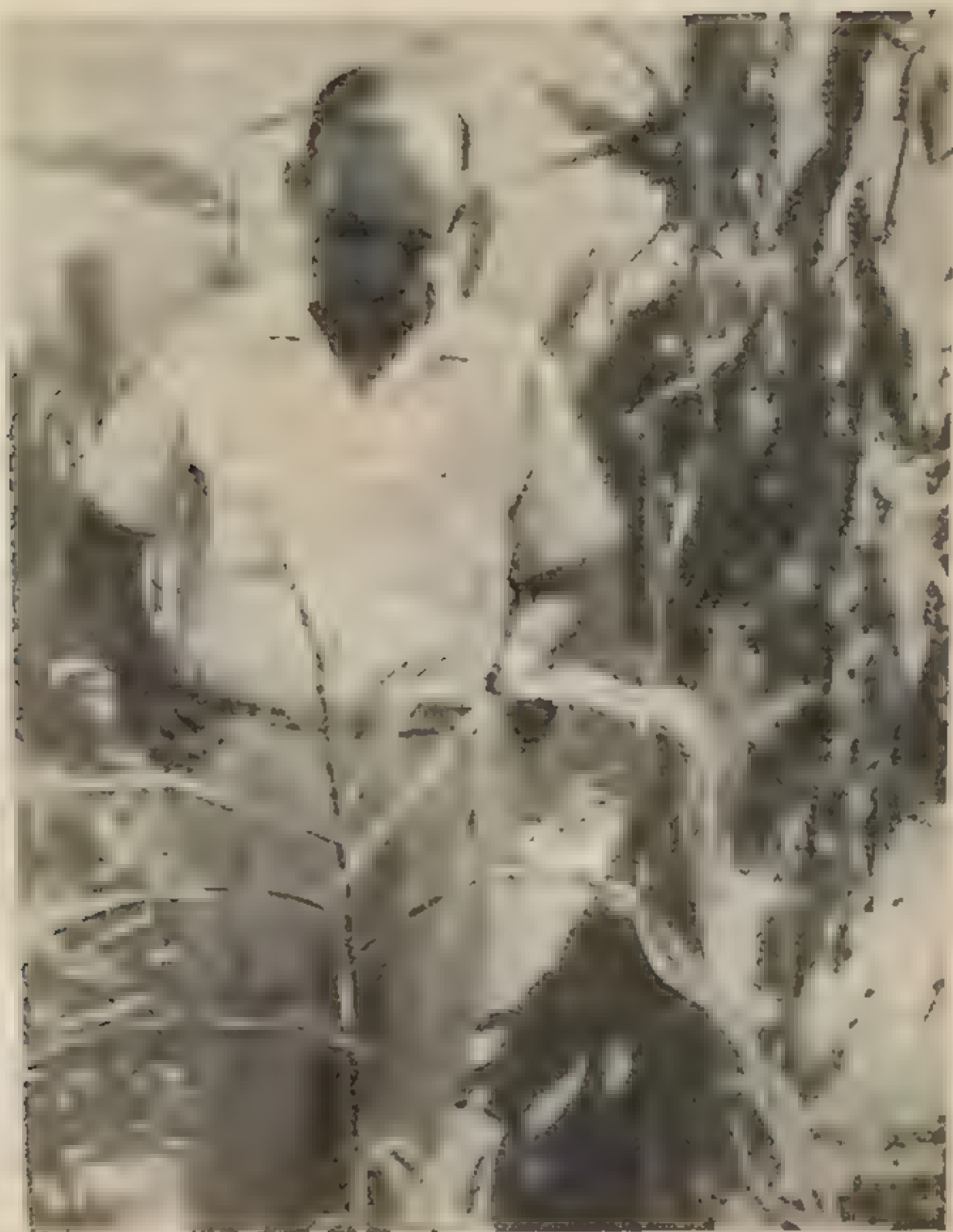


РИС. 29-1.

Маркус М. Родс рассматривает полосатые растения кукурузы. На заднем плане — обычные растения, (1959 г.)

до тех пор, пока не израсходуют запас пищи в семени, и погибнут, так как фотосинтетическое образование сахара не идет без хлорофилла. Поэтому ядерные гены, приводящие к проявлению проростков-альбиносов, действуют как летали.

Некоторые растения кукурузы имеют мозаичные листья с зелеными и белыми полосами (рис. 29—1)¹. Хотя лейкопласты белых частей не могут позеленеть, белые участки выживают, получая питание от зеленых. Основан ли этот мозаицизм на ядерных генах, заставляющих разные участки листа развиваться по-разному? Если подобная полосатость — эффект ядерного гена, влияющего на дифференцировку, то такой ген передавался бы через мужскую или женскую гамету вне зависимости от того, какая ткань — белая или зеленая — привела к образованию репродуктивных органов.

Иногда кукурузный початок образуется из завязи, которая мозаична, так как она происходит частично из зеленой, а частично из белой ткани. Если зерна из такого початка посеять рядами соответственно их расположению на початке, то выросшие проростки не бывают все зелеными, все белыми или все полосатыми; не получается и беспорядочной смеси этих типов; вырастают группы зеленых проростков и группы проростков-альбиносов (рис. 29—2). Этот результат позволяет предполагать, что полосатость действительно имеется в завязи и продолжает существовать в початке. Другие исследования этого наследственного свойства показывают, что способность к позеленению или ее отсутствие не зависит от цвета части отцовского растения, образующей ту пыльцу, опыление посредством которой привело к образованию семени. Более того, соответствующие скрещивания показывают, что здесь не участвует ни один из генов материнских

¹ Нижеследующее изложение основано прежде всего на работе М. М. Родса.

или отцовских хромосом. Следовательно, полосатость не обусловлена различным действием ядерного гена в различных тканях. Так как эндоспермное зерно не содержит пластид и единственным решающим фактором оказывается цвет ткани, из которой образуется завязь, то можно заключить, что в этом случае существенной для определения цвета проростков является только природа пластид в разных завязях. Все эти факты заставляют предполагать, что пластиды образуются только из предсуществующих пластид и что дочерние пластиды имеют те же цветовые качества, что и родительские.

Эта гипотеза подвергалась дальнейшей проверке при исследовании цитоплазмы клеток, локализованных на границе белой и зеленой ткани. Было найдено, что эти клетки содержат зрелые пластиды обоих типов (как полностью зеленые, так и совершенно белые), тогда как клетки внутри зеленого сектора содержат только зрелые зеленые пластиды, а клетки в белом секторе — только лейкопласты. Таким образом, даже когда два типа зрелых пластид присутствуют в одной клетке, они не влияют друг на друга и развиваются соответственно своим врожденным возможностям. Если зигота (или другая клетка), содержащая оба типа пластид, образует дочерние клетки, в которые случайно попадают только «белые» или только «зеленые» пластиды, то эти дочерние клетки дадут начало участкам белой и зеленой ткани. На основании представленных результатов (а также других, здесь не упомянутых) можно сделать вывод, что пластиды возникают только из пластид. Следовательно, поскольку пластиды самостоятельно размножаются, мутабельны и способны к воспроизведению своего мутантного состояния, то они, по-видимому, содержат по крайней мере один цитоплазматический ген. В хлоропластах имеется ДНК (R. Sager и M. Ishida, 1963; M. Edelman и др., 1964), однако еще не доказано, что она и является основой обсуждаемых генетических различий. Как уже раньше отмечалось, наличие и свойства хлорофилла зависят также от ядерных генов. Таким образом, они контролируются и ядерным геномом, и геномом пластид.

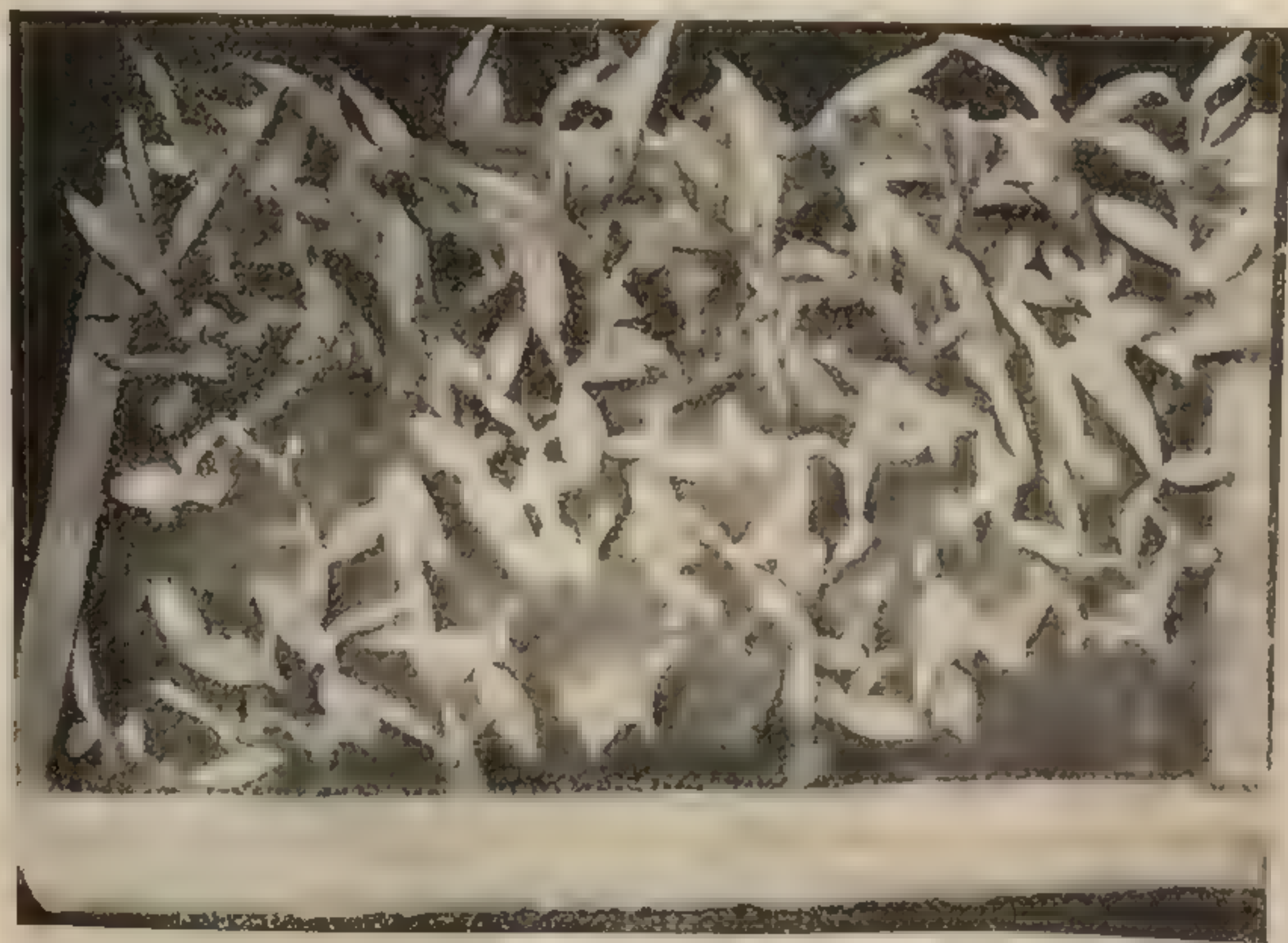


РИС. 29-2.

Группы нормальных сеянцев и сеянцев-альбиносов из семян, посеянных рядами, соответственно их положению в початке, который образовался на полосатом бело-зеленом растении

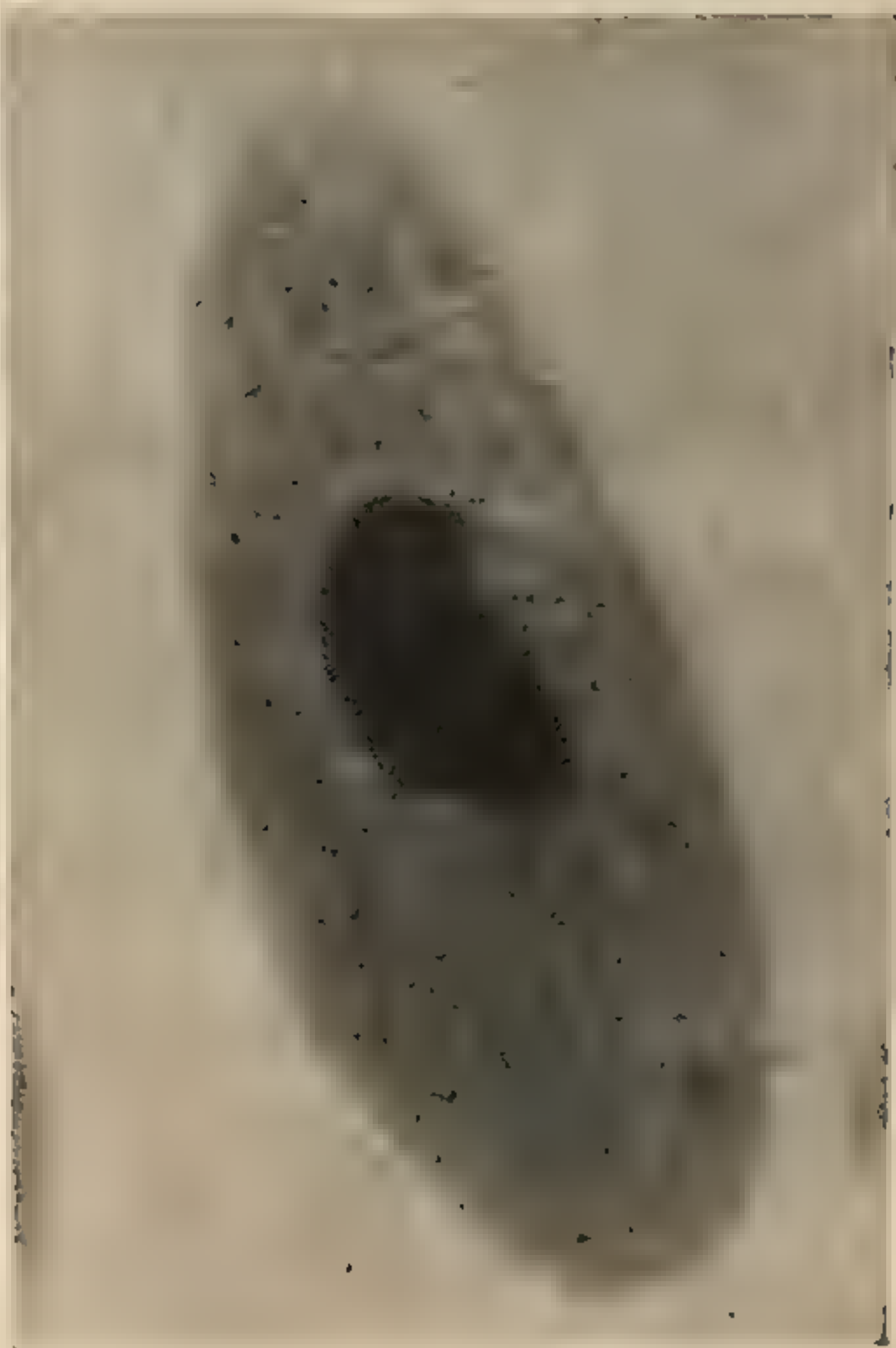


Рис. 29-3.

Нормальная парамеция (слева) и содержащая каппа-частицы (справа) (фото T. Sonneborn)

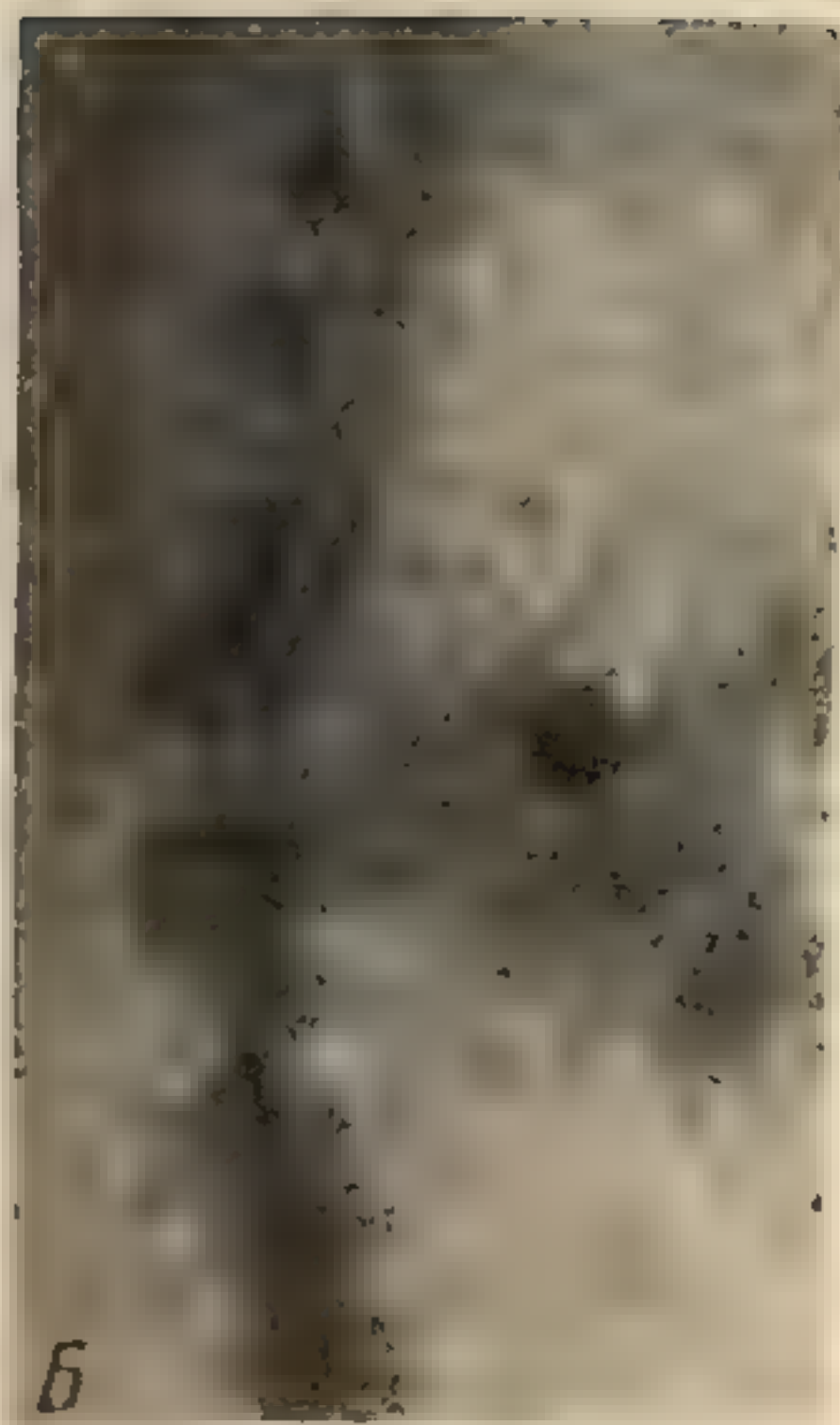
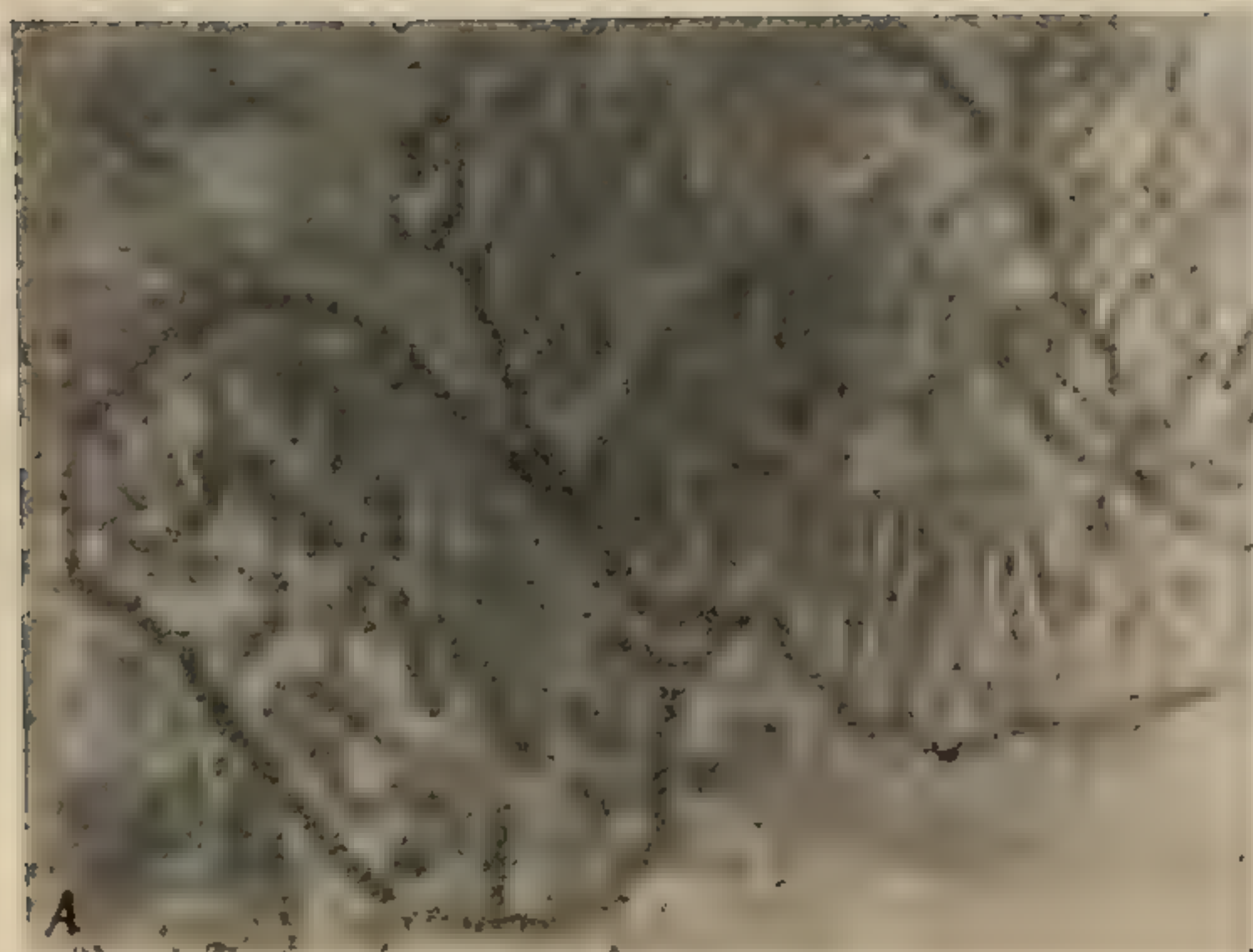


РИС. 29-6.

Электронные микрофотографии

А — митохондрии сердца мыши ($\times 60\,000$);
Б — митохондрии нейроспоры, обработанные таким образом, что видны кристы с прикрепленными к ним элементарными частицами ($\times 67\,200$); В — контур митохондриальной ДНК из нейроспоры ($\times 29\,300$); (фото W. Stoeckenius)

В друго
дало потом
растения го
торому и н
клетках по
лениях, да
ивечивание
биосинтеза
объяснение
ядерный ге
хлорофилла
ром он боле
таты убедит
цироваться
рует образо
у кошачьей

ПАРАМЕЦИИ

Каппа-част
находятся
клетке легк
ДНК (возм
би, содержа
полученная
ные особи,

Известн
Каппа-част
сильно през
пом как «я
достаточно,
чески связа
жения необ
ные по ре
каппа-част
чувствитель
маций чуже
в ней соде
то считается
собой бакт

Хотя ци
может пере
пределение
хозяина.

Кратко
смотрением

Типична
степени по
Когда роди
образуются
микронукле
дочерних к
мосомам ро
ново межд

¹ Изжеследу
основано гл

В другом опыте скрещивание двух целиком зеленых растений кукурузы дало потомство с белыми и зелеными полосами. Доказано, что полосатые растения гомозиготны по рецессивному ядерному гену, *iojap (ij)*, по которому и их родители были гетерозиготны. Бесцветные пластиды в яйцеклетках полосатых растений остаются бесцветными и в последующих поколениях, даже у гомозигот по нормальному аллелю; таким образом, обесцвечивание пластид не вызвано вмешательством генов *ij ij* в процесс биосинтеза, ведущего к образованию хлорофилла. Единственное простое объяснение такого влияния состоит в том, что в присутствии генов *ij ij* внеядерный ген, локализованный в пластидах и необходимый для образования хлорофилла, каким-то образом мутирует и переходит в состояние, в котором он более не способен осуществлять эту функцию. Полученные результаты убедительно показывают, что мутация внеядерного гена может индуцироваться ядерным геном. Такой же случай, когда ядерный ген контролирует образование хлорофилла, приводя к мутации генов пластид, известен у кошачьей мяты *Nepeta*.

ПАРАМЕЦИЯ¹

Каппа-частицы (и сходные частицы лямбда—«убийцы при спаривании») находятся в цитоплазме определенных линий *Paramecium*. В отдельной клетке легко можно видеть сотни каппа-частиц (рис. 29—3). Они содержат ДНК (возможно, также и РНК) и способны к самовоспроизведению. Особи, содержащие каппа-частицы, называются «убийцами», потому что среда, полученная после культивирования этих парамеций, убивает чувствительные особи, не содержащие каппа-частиц).

Известно, что мутантные каппа-частицы образуют специфические яды. Каппа-частица переходит из клетки в среду, как только в ней развивается сильно преломляющая свет гранула, которая иногда видна под микроскопом как «яркое пятно». Одной каппа-частицы (одного «яркого пятна») достаточно, чтобы убить чувствительную особь. Каппа-частица специфически связана со своим хозяином, поскольку для ее сохранения и размножения необходим доминантный ген хозяина (*K*). Особи—«убийцы», гомозиготные по рецессивному аллелю *k*, не могут поддерживать существования каппа-частиц; через 8—15 делений каппа-частицы теряются и возникают чувствительные особи. Каппа-частица, по-видимому, является для парамеций чужеродным организмом, так как она инфекционна и необязательно в ней содержится. Поскольку лямбда-частица может расти *in vitro*, то считается, что и лямбда- и каппа-частицы парамеций представляют собой бактерии-эндосимбионты (W. van Wagtendonk и др., 1963).

Хотя цитоплазматический бактериальный эндосимбионт каппа-частица может передаваться от одного поколения парамеций к другому, его распределение в следующем поколении зависит от способа размножения хозяина.

Кратко опишем два таких способа—бесполый и половой—в связи с рассмотрением вопроса о передаче каппа-частиц.

Типичная парамеция содержит диплоидный микронуклеус и в высокой степени полиплоидный (около 1000 N) макронуклеус (мегануклеус). Когда родительская клетка размножается бесполым путем—делением, образуются две дочерних парамеции. Реплицируются и разделяются как микронуклеус, так и макронуклеус; когда деление закончено, в обеих дочерних клетках оказываются хромосомы, идентичные друг другу и хромосомам родительской клетки. Хотя цитоплазма не распределяется одинаково между дочерьми, родитель—«убийца» обычно дает двух дочерей-

¹ Нижеследующее рассмотрение цитоплазматической наследственности у парамеций основано главным образом на работах Т. М. Зоннеборна и сотрудников.

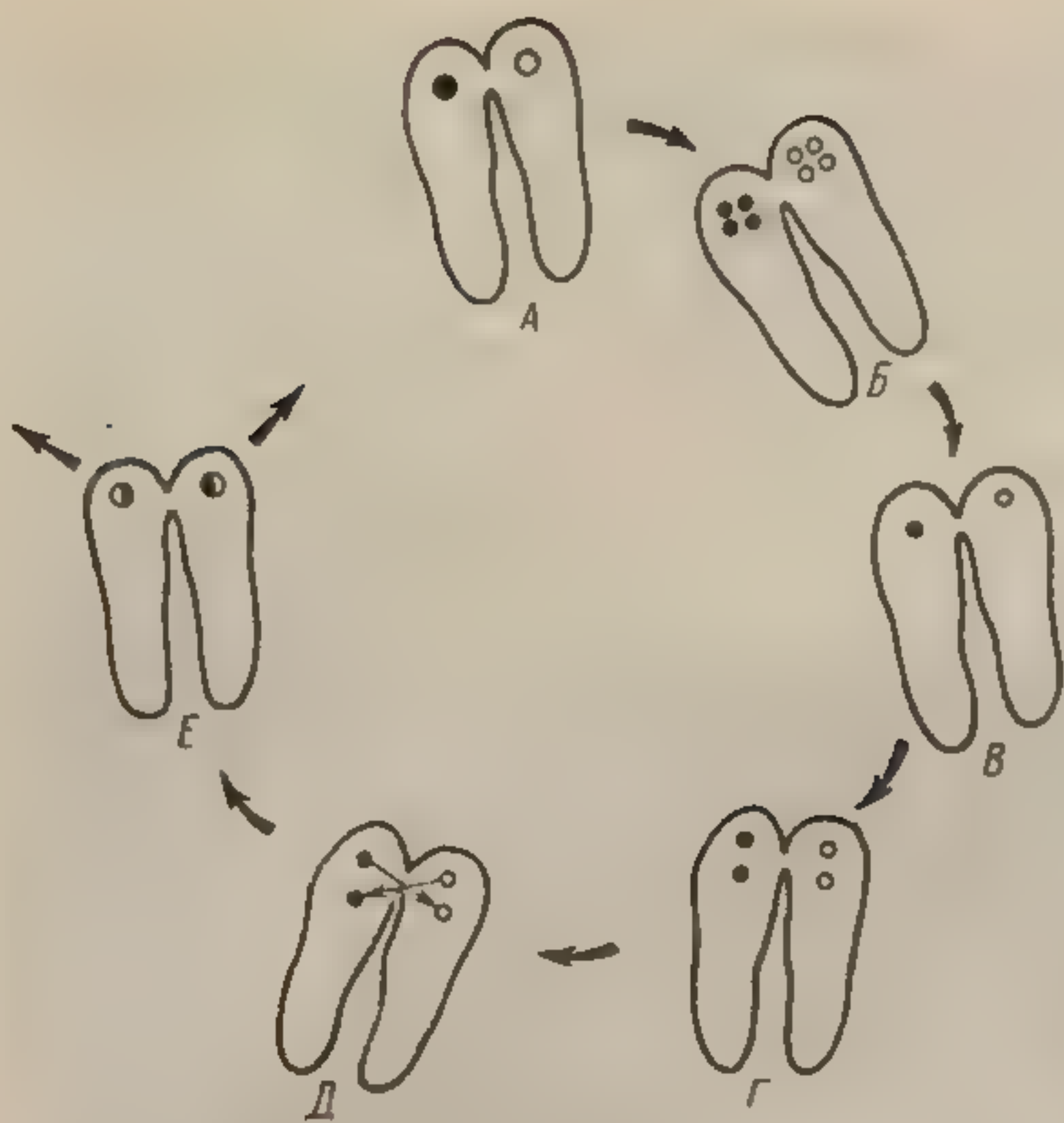


РИС. 29-4.

Схематическое изображение изменений макронуклеуса в процессе конъюгации парамеций.

Каждый конъюгант имеет один диплоидный макронуклеус (А), который после мейоза дает четыре гаплоидных ядра (Б). Три из них распадаются (В), а остающееся ядро делится один раз митотически (Г). Одно из образовавшихся гаплоидных ядер участвует в обмене между конъюгантами (Д), после чего гаплоидные ядра сливаются (Е). Таким образом, каждый конъюгант, который потом делится, содержит один диплоидный макронуклеус.

«убийц», так как каждая получает несколько сот каппа-частиц, имевшихся в родительской цитоплазме. Последовательные деления дочерей-«убийц» приведут к образованию клона парамеций-«убийц» с идентичными хромосомами. Точно так же последовательные деления чувствительных парамеций дадут клон чувствительных особей.

Новое поколение может образоваться и половым путем. Все члены клона обладают одним и тем же типом спаривания. Если же смешиваются клоны с разными типами спаривания, то наблюдается *реакция спаривания*, в которой участвуют особи с разными типами спаривания, слипающиеся друг с другом и образуя все увеличивающийся сгусток парамеций. После такого слияния члены пары, имеющие разный тип спаривания, конъюгируют. В процессе конъюгации (рис. 29—4) макронуклеус каждой спаривающейся клетки делится мейотически с образованием четырех гаплоидных ядер, из которых три затем распадаются. Остающееся ядро делится митотически, образуя два гаплоидных ядра. Затем одно из двух гаплоидных ядер каждого конъюганта мигрирует в другой конъюгант, где оно соединяется с неподвижным гаплоидным ядром. Таким образом в каждом конъюганте образуется одно диплоидное ядро. Макронуклеус в процессе конъюгации распадается.

После конъюгации две парамеции разделяются и образуют эксконъюгантов следующего поколения. Так как каждый конъюгант передает идентичное гаплоидное ядро каждому оплодотворяемому макронуклеусу, то оба эксконъюганта обладают идентичными хромосомами, что можно доказать, если использовать различные гены-маркеры. (Когда конъюганты гомозиготны по разным аллелям, эксконъюганты оказываются идентичными гетерозиготами.) Диплоидный макронуклеус в каждом эксконъюганте делится один раз митотически; одна половина дает новый макронуклеус, тогда как другая остается макронуклеусом.

В ряде случаев все конъюганты оказываются устойчивыми к действию «убийц»; благодаря этому удается проследить, как передаются каппа-частицы при конъюгации «убийцы» с чувствительной особью.

Содержимое цитоплазмы конъюгантов обычно не смешивается, границу между ними вероятно может переходить только мигрирующее гаплоидное ядро, так что обмена цитоплазмой либо не происходит совсем, либо он крайне незначителен. Следовательно, содержание каппа-частиц в эксконъюгантах такое же, как в конъюгантах; одна особь будет «убийцей», а другая — чувствительной особью. Однако в особых условиях между конъюган-

тами образуется широкий мост, который позволяет цитоплазме обоих спаривающихся партнеров перетекать и смешиваться (рис. 29—5). Степень смешивания цитоплазмы можно контролировать экспериментально. Если смешивание цитоплазмы «убийцы» и чувствительной особи протекает достаточно интенсивно, то каппа-частицы попадают в чувствительный конъюгант и оба эксконъюганта становятся «убийцами».

Рассмотрим, как распределяются при конъюгации специфические ядерные гены. Если микронуклеус каждого конъюганта гетерозиготный, Aa , то лишь случай определяет, какое из четырех гаплоидных ядер, образовавшихся при мейозе, сохранится: A , A , a или a . Поэтому, независимо от того, смешивается ли цитоплазма конъюгантов, оба эксконъюганта будут иметь генотип AA в 25% случаев, Aa в 50% случаев и aa в 25% случаев. Подчеркнем еще раз, что оба эксконъюганта идентичны по генам микронуклеуса и оба образуют клоны, идентичные фенотипически в отношении свойств, определяемых генами микронуклеуса. Однако, когда имеют дело с характеристикой, определяемой цитоплазматической частицей, такой, как каппа, то результат может быть другим. В данном конкретном случае скрещивание чувствительного индивидуума с «убийцей» дает эксконъюгант, свойства которого зависят от того, произошло ли смешивание цитоплазмы.

Особое значение каппа-частицы состоит в том, что на ее примере видно, как микроорганизм-симбионт может так хорошо приспособиться к своему хозяину, что становится частью генетической системы хозяина и определяет некоторые его свойства. Как и каппа-частицы, риккетсия, вызывающая геморрагическую лихорадку Скалистых гор, переносится через цитоплазму клеток-носителей. Эти риккетсии, равно как и уже рассмотренные сигма-частицы и спирохеты, также определяют некоторые свойства своих хозяев. Хотя каждый из этих организмов кажется чужеродным по отношению к своему хозяину, мы не можем с уверенностью сказать, был ли он изначально паразитом или симбионтом.

Могли ли теперешние чужеродные внутриклеточные организмы быть когда-то частью нормального клеточного генома? Этот вопрос особенно уместен, когда дело касается вирусов. На основании данных, которые приводились в предыдущих главах, становится очевидным, что нельзя считать все вирусы чужеродными инфекционными агентами. Современные вирулентные фаги ведут себя как чужеродные организмы, когда они лизируют бактерий-хозяев. Однако литическая способность фагов зависит как от их собственного генотипа, так и от генотипа хозяев, и при определенных генотипических условиях лизис происходит очень редко. В отношении умеренных фагов особенно трудно определить границу между нормой и отклонением от нее; эти вирусы характеризуются не только ослабленной способностью к лизису (хотя они способны к трансдукции); те же самые гены, которые характерны для их профагов, по-видимому, связаны с частью нормальной бактериальной хромосомы. Чем больше будет известно о вирусах, и в особенности о фагах, тем, несомненно, более сильному пересмотру подвергнется наше представление о том, что является генетически «нор-

РИС. 29-5.

Силуэты конъюгирующих парамеций

А — в норме смешивания цитоплазмы не происходит;
Б — широкий мостик обеспечивает смешивание цитоплазмы



мальным», а что — «чужеродным» (А. Campbell, 1961). Когда увеличатся наши знания о генетике вирусов и их «хозяев», мы лучше сможем объяснить, как возникли вирусы.

ХЛАМИДОМОНАДА

Chlamidomonas reinhardi представляет собой одноклеточное растение с двумя жгутиками и единственным хлоропластом. Размножаясь бесполом путем с помощью митотического деления, оно может образовывать клоны. Среди членов одного клона не наблюдается полового процесса, но если смешать особей двух разных клонов, то они могут спариваться, сливаться и образовывать зиготы. В результате двух делений зигота образует четыре клетки, каждая из которых может дать начало отдельным клонам. Когда каждый из четырех клонов смешивался с разными порциями пятого клона, то два клона из четырех с ним спаривались (их пол обозначается как —), а два других — не спаривались (потому их пол обозначается как +). Более того, если отдельные порции четырех культур, полученных от одних и тех же родителей, объединить попарно, то оказывается, что особи любой «+» культуры могут спариваться с любой «—» культурой. Однако две «+» или две «—» культуры друг с другом не спаривались. Между индивидуумами «+» и «—» не было обнаружено никаких морфологических различий.

Среди первых четырех клеток, образующихся из зиготы, две относятся к типу «+», а две другие — к типу «—». Этот результат заставляет предполагать, что зигота диплоидна и несет пару генов, определяющих пол (которые мы можем назвать mt^+mt^-), а мейоз осуществляется во время последних двух делений. Следствием этого мейоза является равное 1,0 отношение $mt^+:mt^-$ среди образовавшихся гаплоидных клеток. Следовательно, тип спаривания ведет себя как свойство, определяемое двумя различными аллелями одного ядерного гена.

Хламидомонада дикого типа чувствительна к стрептомицину. После инкубации со стрептомицином обнаруживается большое количество «заранее адаптированных» мутантов, которые дают особей, устойчивых к 100 мкг стрептомицина в пробе, хотя они остаются чувствительными к 300 мкг стрептомицина в пробе. Поскольку скрещивание с чувствительной к стрептомицину линией приводит к выщеплению двух чувствительных и двух устойчивых особей (точно так же, как выщепляются аллели, определяющие пол), то это указывает на хромосомную природу мутации. Эти хромосомные мутанты относятся к классу *sr-100*. Стрептомицин действует не только как селективный агент, но и как мутаген, образуя особи, называемые мутантами *sr-500* (устойчивые к 500 мкг стрептомицина на пробу). Мутанты *sr-500* не дают выщепления после мейоза в гаплоидном потомстве F_1 или в потомстве от обратного скрещивания. Более того, при скрещивании с *sst* особями (стрептомицинчувствительными) обычно все потомство получает фактор *sr-500*, когда *sr-500* относится к типу $+(mt^+)$. Когда родительская клетка *sr-500* относится к типу $-(mt^-)$, то ни одна из особей потомства не получает фактора *sr-500*. Эти и другие особенности показывают, что свойство *sr-500* определяется «нехромосомным» геном, т. е. геном, который не подчиняется обычным правилам передачи хромосомных генов у особей, размножающихся половым путем. Стрептомицин индуцирует, кроме того, большое число ауксотрофных мутантов, обусловленных также нехромосомными генами.

Как исключение, встречаются зиготы, которые содержат нехромосомные гены обоих родителей. С помощью таких зигот и при использовании монофакториальных и реципрокных бифакториальных скрещиваний можно показать, что нехромосомные гены рекомбинируют при постмейотических делениях.

Эти и
ние общ
Некотор
есть данн
основани

МИТОХО

Митохонд
гладкой
двуслойн
D. Green,
мость; вн
большую
состоит в
наблюдат
делением;
ся путем
ДНК пред
1963, G. S
плавучей

Некото

Когда так
то после
(нормальн
ствием мут
petites. Е
вым красн
petites (В.
мутантам
petites, ка
акридинов
с их неспо
они предст
ный рост ос
которые, к
tites не обн
шенно ясно
контролиру
Однако по
в митохонд

У нейро
линией не д
(М. а. Н. М
мутации вн
менты, в но
хондрий. С
зованию *ge*
гифы сначал
roky, приче
результатом
мосомного
локализации
вестна.

¹ Сейчас
кольцо (Wes
перев.

Эти исследования (R. Sager, 1965) заставляют предполагать существование обширной внехромосомной генетической системы у хламидомонад. Некоторые из этих генов могут быть локализованы в ДНК хлоропласта; есть данные, согласно которым эта ДНК достоверно отличается по составу оснований от ДНК ядра хламидомонад.

МИТОХОНДРИИ

Митохондрии — это органеллы (рис. 29—6), состоящие из непрерывной гладкой наружной мембраны и внутренней мембраны, образующей двуслойные внутренние складки, или кристы (D. Parrons, 1963; D. Green, 1964). Наружная мембрана, вероятно, контролирует проницаемость; внутренняя мембрана, ее кристы и элементарные частицы содержат большую часть нерастворимых дыхательных ферментов, функция которых состоит в обеспечении основного источника энергии для клетки. Удавалось наблюдать митохондрии, которые как будто размножались поперечным делением; возможно, что большая часть, если не все митохондрии, образуется путем деления предсуществующих митохондрий (D. Luck, 1963). ДНК представляет собой обычный компонент митохондрий (M. Chevremont, 1963, G. Schatz и др., 1964). Эта ДНК (рис. 29—6) обладает специфической плавучей плотностью и, вероятно, двунигчатая (D. Luck и E. Reich, 1964)¹.

Некоторые линии дрожжей образуют на агаре очень мелкие колонии. Когда такие организмы скрещиваются с особями нормального размера, то после выщепления в продуктах мейоза наблюдается соотношение 2 (нормальные особи):2 (мелкие). Такие «мелкие» линии, вызванные присутствием мутантных ядерных генов, называются *сегрегационными мутантами petites*. Если нормальные дрожжевые клетки обработать акридиновым красителем (эуфлавином), то возникают многочисленные колонии *petites* (B. Ephrussi, 1953). Когда эти линии, называемые *вегетативными мутантами petites*, скрещиваются с нормальными дрожжами, то фенотип *petites*, как правило, не выщепляется. Легкость, с которой при помощи акридиновых красителей образуются вегетативные формы *petites*, наряду с их неспособностью к выщеплению, достаточно хорошо доказывает, что они представляют собой внехромосомные мутанты. Характерный медленный рост особей *petites* приписывается отсутствию дыхательных ферментов, которые, как известно, локализованы в митохондриях. Хотя у особей *petites* не обнаружено никаких изменений в морфологии митохондрий, совершенно ясно, что присутствие определенных митохондриальных ферментов контролируется как хромосомными, так и внехромосомными генами. Однако пока еще не доказано, что эти внехромосомные гены локализованы в митохондриальной ДНК.

У нейроспоры медленно растущая линия, *roky*, при скрещивании с дикой линией не дает выщепления; этот признак не связан ни с одной из хромосом (M. а. Н. Mitchell, 1952). Очевидно, фенотип *roky* возник в результате мутации внехромосомного гена. У особей *roky* изменены как некоторые ферменты, в норме присутствующие в митохондриях, так и морфология митохондрий. Слияние гифов дикого типа и гифов линии *roky* приводит к образованию *гетероцитосомы* — смеси двух типов цитоплазмы. Такие слившиеся гифы сначала похожи на гифы дикого типа, но позднее принимают фенотип *roky*, причем генотип ядра на этот процесс не влияет. Является ли это результатом преимущественной селекции, по-видимому, вредного внехромосомного гена? Мы этого не знаем. Как и в случае мутантов *petites*, локализация внехромосомных генов, определяющих фенотип *roky*, неизвестна.

¹ Сейчас твердо установлено, что двунигчатая ДНК митохондрий замкнута в кольцо (Westerholme D. R. и David J. B. — *Chromosoma*, 1957, 20, 445). — Прим. перев.

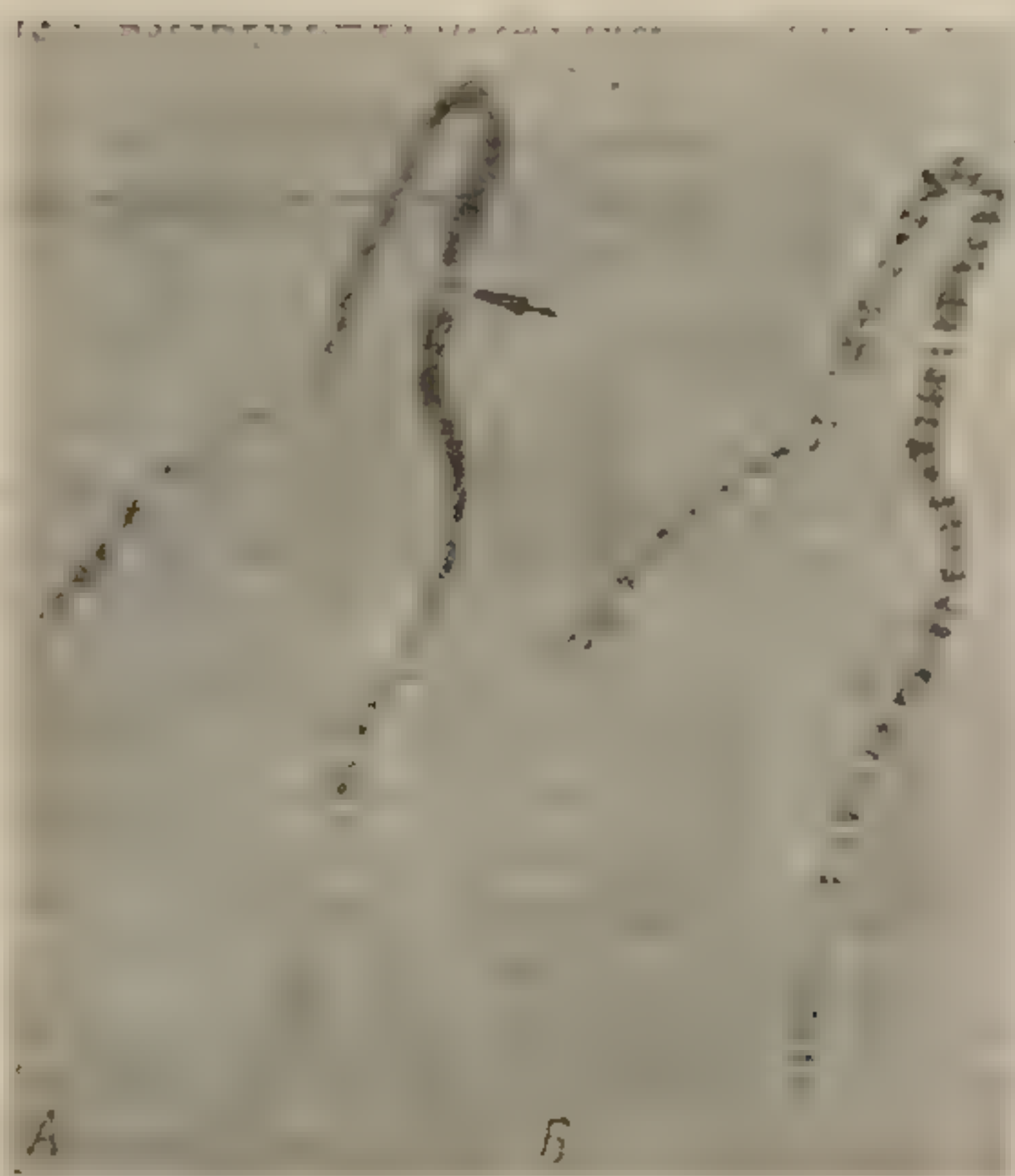


РИС. 29-7.

Центромера и ее гранулы у кукурузы
(A. Lima de Faria. J. Heredity, 1958, 49, 299)

ЦЕНТРОСОМЫ, КИНЕТОСОМЫ И КИНЕТОПЛАСТЫ

Центросома — органелла, часто встречающаяся у каждого из полюсов веретена, особенно в животных клетках. Иногда внутри нее видна гранулярная структура — *центриоль*; подобные гранулы можно иногда видеть внутри центромеры (рис. 29—7). Гранулы внутри центромеры и центросомы окрашиваются одинаково (обе, по-видимому, содержат ДНК), так же как и вещество, окружающее эти гранулы. В живой клетке центромера и центросома имеют одинаковый вид. По-видимому, гранулы внутри центромеры представляют собой утолщения нитей ДНК, которые проходят из одного плеча хромосомы в другое.

Иногда центромеры притягиваются друг к другу и к центросомам, а в анафазе цент-

ромеры мигрируют к центросомам. Центросома также может двигаться, что можно видеть перед анафазой и после проникновения спермия в яйцеклетку. Таким образом, мы видим, что морфологическому сходству центромеры и центросомы соответствует их одинаковое поведение.

Эти факты наводят на мысль об определенном сходстве¹ между центросомой и центромерой. Такая точка зрения подтверждается данными (А. а. Р. Pollister, 1943) о том, что в процессе мейотических делений при образовании спермиев у некоторых моллюсков определенные хромосомы дегенерируют и освобождаются «голые» центромеры. Эти новые свободные центромеры группируются вместе с центросомой, после чего точно воспроизводят внешний вид и поведение центросомы. Следовательно, свободные центромеры в действительности становятся экстра-центросомами. Приведенные данные заставляют предполагать, что центромера и центросома могут представлять собой два состояния существующей в настоящее время или когда-то существовавшей эписомы. Вероятно, переход из одного состояния эписомы в другое осуществляется под влиянием ядерной мембраны и других генетических факторов, существующих в высокоорганизованной клетке, а также в результате мутаций эписомы, находящейся в интегрированном или автономном состоянии.

У основания каждой реснички или жгутика имеется гранулярное тельце, *кинетосома*, которая ответственна за движение органеллы. Были получены многочисленные доказательства в пользу того, что кинетосомы содержат ДНК и гомологичны центриолям (или центросомам). Возможно, что кинетосомы также являются эписомами или производными эписом. Было высказано предположение, что F-эписома функционирует как центромера. Может быть, движения фактора F, центромеры и центросомы имеют ту же основу, что движения жгутиков и ресничек, осуществляемые кинетосомами?

¹ Впервые это положение высказали К. Д. Дарлингтон, Ф. Шрадер и др.

У трипа
сте, больш
участвует
происходит
кой акриди
видимому,
о его молек

ЗАКЛЮЧЕНИ

Ядерные кл
В некоторых
лены чужер
частицы); в
понентами
и кинетопла
предполагат
от них. ДНК
тивностью с

Известно,
двумя путям
и те и други
фенотипа.

ВОПРОСЫ ДЛ

29—1. Что
в результате
29—2. Как
тельность к
геном?



ТРЕЙСМ М. СОННЕБОРН
(1966 г.)

У трипаносомы ДНК и гистоноподобный белок находятся в *кинетопласте*, большой цитоплазматической органелле, которая, как и митохондрии, участвует в движении клетки. В ядре и кинетопласте репликация ДНК происходит синхронно. Кинетопласт можно необратимо повредить обработкой акридиновыми красителями. Поскольку кинетопласт содержит, по-видимому, заметные количества ДНК, то дополнительная информация о его молекулярной структуре была бы крайне ценной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ядерные клетки могут содержать обширную систему внеядерных генов. В некоторых случаях внеядерные гены, по-видимому, могут быть представлены чужеродными организмами (вирусы, капса- и, возможно, сигма-частицы); в других случаях они, вероятно, связаны с нормальными компонентами клетки (пластиды, митохондрии, центросомы, кинетосомы и кинетопласты). Свойства центросом, кинетосом и центромер позволяют предполагать, что они родственны эписомам или когда-то произошли от них. ДНК пластид и митохондрий сейчас уже прямо связывается с активностью специфических генов.

Известно, что ядерные и внеядерные гены могут взаимодействовать двумя путями: ядерные гены могут приводить к мутациям внеядерных, и те и другие могут взаимодействовать при создании индивидуального фенотипа.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

29—1. Что нового можно узнать о взаимодействиях ядра и цитоплазмы в результате изучения фактора F и умеренных фагов?

29—2. Какие данные Вы можете представить в пользу того, что чувствительность к CO_2 обусловлена вирусом, а не нормальным хромосомным геном?

29—3. Какие тесты (рекомбинационные, мутационные, функциональные, химические) были применены для доказательства существования внеядерных генов? Предполагается ли при этом, что эти гены способны к самостоятельному воспроизведению? Почему?

29—4. Обсудите закономерности генетического контроля образования хлорофилла у кукурузы.

29—5. Имеет ли какое-нибудь отношение изучение взаимодействий ядра и цитоплазмы у парамеции к процессам дифференцировки у многоклеточных организмов? Объясните.

29—6. Каковы особые преимущества парамеции как объекта для экспериментального генетического исследования?

29—7. Некоторые парамеции относятся к «тонким» (thin), что определяется полностью рецессивным ядерным геном, *th*. Какой фенотип можно ожидать для клонов, полученных от эксконъюгантов в результате однократного спаривания $++$ и $+th$? Как могло бы повлиять на фенотип смешивание цитоплазмы? Почему?

29—8. Исходя из определения хромосомы, данного на стр. 14, можно ли сделать заключение, что капша-частица представляет собой хромосому или содержит хромосому? Дайте обоснованный ответ.

29—9. Учитывая трудности доказательства существования внеядерных генов, что нужно считать первичным генетическим материалом клеточных организмов? Ядерный или внеядерный генетический материал? Объясните.

29—10. Обсудите заявление (стр. 269) о том, что ДНК, «по-видимому, не содержится в цитоплазме».

29—11. Являются ли решающими представленные доказательства в пользу того, что пол у хламидомонады определяется главным образом одной парой генов? Подтвердите свой ответ.

29—12. Приведите какие-либо доказательства, полученные после написания этой главы (ноябрь, 1964), в пользу того, что ДНК хлоропластов или митохондрий влияет на фенотип.

ЛИТЕРАТУРА

- C. Barigozzi. Relationship between Cytoplasm and Chromosome in the Transmission of Melanotic Tumours in *Drosophila*. In: «Biological Organization». N. Y., Acad. Press, 1963, p. 73.
- G. H. Beale. The Genetics of *Paramecium Aurelia*. Cambridge, 1954.
- A. Campbell. Conditions for the Existence of Bacteriophage.—*Evolution*, 1961, 15, 153.
- M. Chèvremont. Cytoplasmic Deoxyribonucleic Acids: Their Mitochondrial Localization and Synthesis in Somatic Cells Under Experimental Conditions and During the Normal Cell Cycle in Relation to the Preparation for Mitosis.—*Sympos. Internat. Soc. Cell. Biol.*, 1963, 2, 323.
- M. Edelman, C. A. Cowan, H. T. Epstein, J. A. Schiff. Studies of Chloroplast Development in *Euglena*, VIII. Chloroplast-Associated DNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 1214.
- B. Ephrussi. Nucleo-Cytoplasmic Relations in Micro-Organisms. Oxford, 1953.
- D. E. Green. The Mitochondrion.—*Scient. Amer.*, 1964, 210, 63, 152. (Д. Грин. Митохондрия.—Сб. «Структура и функции клеток.» М., изд-во «Мир», 1964).
- P. L. Heritier. The Hereditary Virus of *Drosophila*.—*Advances Virus Res.*, 1958, 5, 195.
- D. J. L. Luck. Genesis of Mitochondria in *Neurospora crassa*.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 49, 233.
- D. J. L. Luck, E. Reich. DNA in Mitochondria of *Neurospora crassa*.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 931.
- M. B. Mitchell, H. K. Mitchell. A Case of «Maternal» Inheritance in *Neurospora crassa*.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1952, 38, 442.
- D. F. Parsons. Mitochondrial Structure: Two Types of Subunits on Negatively Stained Mitochondrial Membranes.—*Science*, 1963, 140, 985.
- N. Plus. Action de la 5-Fluoro-Desoxyuridine sur la Multiplication du Virus σ de la *Drosophile*.—*Biochim. et biophys. acta*, 1963, 72, 92.
- A. W. Pollister, P. F. Pollister. The Relation Between Centriole and Centromere in Atypical Spermatogenesis of Viviparid Snails.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1943, 45, 1.

M. M. R. 11, 2
M. M. R. gy of (Ed.)
R. Sager жер
R. Sager U. S.
G. Schatz Mitoc
R. L. See Harbo
T. M. Son the 20
T. M. Son 1959,
T. M. Son 46, 14
W. J. van Relate

- M. M. Rhoades. Plastid Mutations.—Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol., 1946, 11, 202.
- M. M. Rhoades. Interaction of Genic and Non-Genic Hereditary Units and the Physiology of Non-Genic Inheritance. In: «Encyclopedia of Plant Physiology», W. Ruhland (Ed.). Berlin, 1955, vol. 1, p. 19.
- R. Sager. Genes Outside the Chromosome.—Scient. Amer., 1965, 212, 70, 134. (Р. Сэд-жер. Гены вне хромосом.—Сб. «Молекулы и клетки». М., изд-во «Мир», 1966).
- R. Sager, M. R. Ishida. Chloroplast DNA in Chlamydomonas.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 725.
- G. Schatz, E. Haslbrunner, H. Tuppy. Deoxyribonucleic Acid Associated with Yeast Mitochondria.—Biophys. and Biochem. Res. Commun., 1964, 15, 127.
- R. L. Seeco/. CO₂ Sensitivity in *Drosophila* as a Latent Virus Infection.—Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1962, 26, 501.
- T. M. Sonneborn. The Role of the Genes in Cytoplasmic Inheritance. In.: «Genetics in the 20th Century», L. C. Dunn (Ed.), 1951, Chap 14, p. 291.
- T. M. Sonneborn. Kappa and Related Particles in *Paramecium*.—Advances Virus Res., 1959, 6, 299.
- T. M. Sonneborn. The Gene and Cell Differentiation.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 149.
- W. J. van Wagtendonk, J. A. D. Clark, G. A. Godoy. The Biological Status of Lambda and Related Particles in *Paramecium aurelia*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 835.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МУТИРОВАНИЯ

В главах 11, 12 и 14 были рассмотрены различные единицы мутирования — от самых больших изменений, затрагивающих весь геном, до самых малых изменений отдельных генов. Различные внешние агенты могут вызывать появление мутаций всех типов (главы 13 и 16), но хотелось бы знать, в какой степени мутабельность регулируется самим генотипом.

Процесс митоза настолько точен, что обычно генотип препятствует возникновению в ряде клеточных поколений изменений всего генома или целой хромосомы. Ориентация веретена, скорость митоза и другие его свойства контролируются генами.

У *Ascaris* генотип, по-видимому, предохраняет полицентрическую хромосому от мутационного изменения, подавляя функционирование всех центромеров, за исключением одного.

При мейозе перекрест происходит в точно соответствующих друг другу участках двух не сестринских нитей, так что не возникает кроссоверов, содержащих нехватки или дубликации. Это положение подтверждается, например, данными Г. Маньи (1963). Таким способом сохраняется внутрихромосомная эуплоидия, даже если происходят рекомбинации между гомологичными хромосомами. При мейозе конъюгация и образования хиазм помогают распределить гомологичные хромосомы так, чтобы предотвратить утрату или добавление целых хромосом, т. е. развитие анеупсомии. Наличие коллохор у дрозофилы (стр. 199, 200) и генов, вызывающих асинапсис, которые обнаружены у кукурузы (стр. 204), у многих других видов растений и у дрозофилы, показывает, что синапсис находится под генетическим контролем. И для дрозофилы, и для кукурузы известны гены, приводящие к появлению веретен, которые во время мейоза отклоняются от полюсов. В общем случае синтез новых генов обычно регулируется таким образом, чтобы предотвратить замещение «правильного» генетического материала «неправильным» генетическим материалом, в случае, если оба типа генетического материала окажутся одновременно в одной и той же клетке.

Мне могут возразить, указав, что приведенные примеры свидетельствуют лишь о том, что снижение мутабельности — это естественное следствие нормальной работы клетки. Современные генотипы действительно могут играть здесь пассивную роль; однако митоз и мейоз не относятся к искомым свойствам генов или клеток. Поэтому в процессе эволюции отбор генов по этим свойствам должен был быть активным процессом, направленным на снижение мутабельности: должны были иметь преимущество гены, которые могли поддерживать стабильность генома и одновременно допускать репликацию и генетическую рекомбинацию при половом процессе.

Тот генетический контроль, о котором до сих пор шла речь, приводит к снижению мутабельности. Следует, однако, четко представлять себе, что генотип допускает также возникновение контролируемых или регулируемых генетических изменений. Это изменения следующих типов.

1. Изменения ploidy в половом цикле — от диплоидного состояния к гаплоидному и обратно — находятся под генетическим контролем.

2. Мутационные изменения возрастают с увеличением митотической активности (стр. 207). Частота митозов контролируется генами (многие раковые клетки — это мутанты с увеличенной частотой митозов); поэтому через эту частоту генотип контролирует мутабельность.

3. Мы уже упоминали (глава 11) о некоторых модификациях мейоза, которые несомненно контролируются генетически и приводят к изменению плоидности в следующем поколении.

4. Генетически контролируемое изменение происходит даже в соматических тканях многоклеточного организма в тех клетках, где хромосомы оказываются полиплоидными (как в печени человека) или полинемными (как в слюнных железах личинок *Diptera*).

5. Уже отмечалось, что изменения, происходящие в соматических тканях *Ascaris* (стр. 203), приводят к образованию нескольких небольших хромосом из одной крупной хромосомы.

6. Было показано, что частота нерасхождений, приводящих к анеупсомии, зависит от количества и распределения гетерохроматина, а также от типов хромосомных перестроек, имеющих в хромосомах. Следовательно, генотип, поскольку он регулирует свой гетерохроматин и перестройки, регулирует также и возникновение нерасхождений.

7. Подобным же образом расположение продуктов мейоза в овогенезе дрозофилы (глава 12) приводит к элиминированию дицентриков, возникающих при перекресте у гетерозигот по парацентрической инверсии.

8. Наконец, расположение хромосомного материала и метаболическая активность клетки (влияющая, например, на содержание в ней воды и кислорода) представляют собой другие способы регулирования генотипом своей собственной мутабельности.

Вышесказанное касалось в основном предотвращения или регулирования возникновения межгенных изменений. Регулирует ли генотип возникновение точечных мутаций? Сравним частоты спонтанного возникновения точечных мутаций у двух линий одного и того же вида дрозофилы, одна из которых обитает в тропиках, а другая — в умеренном климате. Если бы в природе генотип был во власти температуры, то у тропической формы частота спонтанных точечных мутаций должна была быть выше, чем у формы, обитающей в умеренном климате. Однако, если обе линии выращивать в лаборатории при одинаковой температуре, то у тропической формы скорость мутирования оказывается ниже, чем у формы из умеренного климата. Отсюда следует, что у тропической формы зависимость возникновения мутаций от температуры подавлена генетически (или у формы умеренного климата она генетически усилена). Соответственно, в природе различие в скорости мутирования у этих двух форм, вероятно, меньше, чем этого следовало ожидать, исходя из разницы в температуре. Линии *Drosophila melanogaster*, отловленные в разных географических районах, обладают разными частотами возникновения спонтанных точечных мутаций. Некоторые из этих различий могут быть обусловлены различиями в мутабельности их изоаллелей (стр. 67). Часть их может быть также выражением контроля генотипа над общей мутабельностью, так как у некоторых линий есть *гены-мутаторы*, увеличивающие частоту возникновения всех точечных мутаций весьма заметно (иногда в 10 раз). Конечно, другие аллели генов-мутаторов можно считать супрессорами, подавляющими возникновение всех точечных мутаций. У некоторых организмов (например, у бактерий) встречаются мутации, снижающие мутабельность особи при действии определенного мутагена. Наиболее продвинувшиеся в эволюции организмы содержат и больше генетического материала на клетку, чем организмы, менее продвинувшиеся; поэтому возможно, что наиболее развитые формы обладают отобранными генотипами, в которых частота возникновения спонтанных мутаций понижена, что позволяет избежать избыточного мутирования.

АКТИВАТОР И ДИССОЦИАЦИЯ У КУКУРУЗЫ¹

У одних растений кукурузы триплоидный эндосперм зерен (стр. 3.) не окрашен, у других — окрашен, а у третьих — на неокрашенном фоне есть окрашенные пятна. На первый взгляд могло показаться, что мы имеем дело с высокой частотой мутирования гена из «неокрашенного» аллеля в «окрашенный». Оказалось, однако, что неокрашенный фенотип получается потому, что на одной хромосоме рядом расположены два гена. Если эти два локуса разделяются (диссоциируют) в результате разрыва хромосомы с последующим перемещением одного из локусов, то мутантная клетка и ее дочерные клетки, у которых остался только один локус, будут «окрашены». Перемещенный локус, названный диссоциатором (*Dissociation*, *Ds*), вызывает разрыв в соседних с ним участках хромосомы и расположен, вероятно, в гетерохроматиновом районе. Если *Ds* не диссоциирует от соседнего локуса, то зерно остается неокрашенным. Если он диссоциирует во время формирования зерна, то на белом фоне зерна возникают окрашенные секторы или точки. Если же *Ds* переместился до того, как начало образовываться зерно, то и зерно, и выросшее из него растение целиком «окрашены». У некоторых растений окрашенные пятна велики, что вызвано перемещением *Ds* в начале развития. У других растений пятна небольшие, потому что *Ds* перемещается на более поздних стадиях развития и после его перемещения проходит сравнительно мало клеточных делений. Мутация, которая приводит к изменению окраски, заключается в утрате или перемещении *Ds* в результате разрыва хромосомы. Но изменение окраски, очевидно, не мутационный, а фенотипический эффект, который позволяет обнаружить и доказать наличие мутации. Этот фенотипический эффект зависит от относительного расположения генов, это эффект положения. Присутствие *Ds* рядом с геном окраски подавляет окрашивание. Его отсутствие позволяет гену окраски вырабатывать пигмент.

Разрывы, вызываемые *Ds*, происходят обычно в хромосоме рядом с этим геном; однако они необязательно возникают в одном и том же локусе. Кроме того, разрывы могут происходить одновременно и в других хромосомах (как спонтанно, так и вследствие того, что в них есть другие гены *Ds*). *Ds* не обязательно утрачивается после разрыва. Он может также перемещаться из одного места хромосомы в другое на той же или другой хромосоме. В результате перемещения *Ds* на новое место в ряду поколений может увеличиться число факторов *Ds*, имеющих в эндосперме. Если в определенной области хромосомы увеличивается число генов *Ds*, то в этой области все чаще и чаще происходят разрывы.

Перенесенный в другую хромосому *Ds* может вызывать разрывы рядом со своим новым местом. Поэтому любое перемещение *Ds* влечет за собой мутацию. Такие перемещения *Ds* часто подавляют фенотипическое выражение гена, расположенного рядом с новым местом гена *Ds*. Оставаясь на новом месте, *Ds* ведет к образованию нового фенотипа, симулируя стабильную точечную мутацию гена, расположенного рядом с *Ds*. Более того, каждый раз, когда происходит утрата *Ds* из этого локуса, соседний ген возвращается к своему старому фенотипическому выражению. Если эти перемещения происходят достаточно часто, то их можно ошибочно принять за точечные мутации нестабильного мутабельного аллеля соседнего гена. Если же перемещения *Ds* происходят редко, то можно ошибиться, приняв новый фенотип, к появлению которого приводит соседний с *Ds* ген, за редкое мутационное изменение этого соседнего гена. Пока неясно, какая доля событий, которые мы считаем точечными мутациями некоего гена, представляет собой в действительности эффекты положения, обусловленные супрессией или освобождением от супрессии в результате изменения линей-

¹ По работам Б. Мак-Клинтон.

ного располож
следствием эф
участвуют в эф
в результате
Способности
геном-активато
находиться в т
хромосомах. Б
определенных с
не было ни одн
ние к гену *Ds*
(рис. 30—1). В
довательно, в от
(и не может пере
ре увеличения ч
соответственно у
действия гена *D*
мутабельность —
рывы, но и тот
Ас явно действу



РИС. 30-1.

Влияние «активатора» *Ac* на действие «диссоциатора» *Ds*.

A — фактор *Ac* отсутствует. Зерно не окрашено, так как ген *Ds* присутствует постоянно и подавляет действие соседнего гена, образующего пигмент; *B* — один фактор *Ac*. Разрывы вблизи *Ds* происходят на ранних стадиях развития зерна, что приводит к появлению больших окрашенных секторов; *C* — два фактора *Ac*. Момент действия *Ds* наступает позже, что приводит к образованию меньших по размеру секторов (крапинки); *D* — три фактора *Ac*. Действие *Ds* настолько отсрочено, что возникает небольшое число мелких крапинок (фото В. McClintock)

ного расположения генов. Но, конечно, все точечные мутации не могут быть следствием эффектов положения: ведь различия между генами, которые участвуют в эффекте положения, должны были первоначально возникнуть в результате мутирования.

Способность *Ds* вызывать разрывы в хромосомах контролируется геном-активатором (*Activator*, *Ac*). Ген *Ac* необязательно должен находиться в той же хромосоме, что и *Ds*; обычно *Ac* и *Ds* лежат в разных хромосомах. Вероятно, *Ac* также находится в гетерохроматине. При определенных скрещиваниях были получены зерна, в эндосперме которых не было ни одного гена *Ac*, или был один, два или три гена *Ac*, в дополнение к гену *Ds*, находящемуся рядом с геном, образующим пигмент (рис. 30—1). В отсутствие *Ac* пятна не образуются, все зерно белое. Следовательно, в отсутствие *Ac* ген *Ds* не может вызывать разрыва хромосомы (и не может перемещаться каким-либо другим способом). Более того, по мере увеличения числа генов *Ac* от одного до трех размер окрашенных пятен соответственно уменьшается. Следовательно, *Ac* также задерживает время действия гена *Ds*. Таким образом, генотип в этом случае регулирует свою мутабельность — *Ac* определяет не только способность *Ds* вызывать разрывы, но и тот момент развития, когда должен произойти разрыв. Ген *Ac* явно действует как *ген-регулятор*. Существование генов такого типа

может быть существенным как для циклических метаболических процессов, так и для клеточной дифференцировки и эмбрионального развития. Факторы, подобные *Ac*, довольно распространены у кукурузы. Аналогичными факторами может быть обусловлена неустойчивость фенотипического выражения различных локусов и у других цветковых растений, а также у папоротников, грибов и бактерий.

ИСКАЖЕНИЕ РАСЩЕПЛЕНИЯ У ДРОЗОФИЛЫ

У мух *Drosophila melanogaster*, гомозиготных по мутациям *cinnabar* (*cn*) и *brown* (*bw*), локализованным во II хромосоме, глаза белые, так как *cn/cn* и *bw/bw* препятствуют образованию как коричневого, так и красного пигментов, совокупность которых дает красную окраску глаз у мух дикого типа. При скрещивании $++/cn\ bw \text{ ♂} \times cn\ bw/cn\ bw \text{ ♀}$ обычно получают потомство с таким распределением фенотипов: примерно одна муха с белыми глазами на одну муху типа $+$. Если же немаркированную хромосому II взять из некоторых природных популяций, то при таких скрещиваниях получают от 93 до 99% (вместо обычных 50%) потомства типа $+$ (И. Хирацуми и Дж. Кроу впервые установили этот факт.) Более того, этот необычный результат не связан с увеличением гибели яиц. Поэтому остается заключить, что число участвующих в оплодотворении мужских гамет двух типов ($++$ и *cn bw*) должно быть функционально неравным. Этот вывод наводит на мысль о том, что еще до образования гамет как-то нарушается соотношение $1++ : 1\ cn\ bw$ при расщеплении. Исследование этого искажения расщепления показало, что в хромосоме II, которая по всем другим характеристикам относится к дикому типу, имеется генетический фактор, *искажитель расщепления* (*Segregation-Distorter*), *SD*. Этот фактор расположен в гетерохроматиновом участке правого плеча хромосомы II, недалеко от ее центромера. Хромосома же, которая содержит *cn bw*, несет и *SD+*. Фактор *SD* вызывает генетическое изменение какого-то типа, возможно в локусе *SD+* или вблизи него в гомологичной хромосоме, и это изменение приводит либо к утрате гомолога, содержащего *cn bw*, либо к неспособности спермия, несущего такую хромосому, участвовать в оплодотворении. В результате в F_1 в избытке оказывается хромосома, содержащая *SD*.

Но если в содержащей *SD+* хромосоме есть также и некоторые инверсии, затрагивающие ее правое плечо и отсутствующие в гомологичной хромосоме, то у самца *SD/SD+* искажения расщепления не происходит. Следовательно, для того чтобы *SD* не дал появиться *SD+* в потомстве, должно произойти «спаривание» *SD* и *SD+*. Аллели *SD+* различаются по чувствительности к каждому из *SD*. Аллели *SD*, в свою очередь, различны по способности воздействовать на данный участок *SD+*.

Каждое исходное сочетание *SD/SD+* дает постоянную величину искажения, о чем свидетельствует устойчивость линии *SD*. В хромосоме II, содержащей *SD*, все рекомбинанты по концу правого плеча (возможно, гетерохроматиновому) оказываются менее устойчивыми. Снижение устойчивости проявляется в колебаниях способности искажать расщепление. Следовательно, устойчивая линия должна иметь на конце правого плеча хромосомы II модифицирующий ген, *стабилизатор SD*, *St (SD)*. Стабилизация происходит независимо от того, в цис- или в транс-положении находится *St (SD)* относительно гена *SD*.

Маркеры *purple* (*pr*) и *cn* лежат недалеко и от центромера, и от локуса *SD*, что позволяет изучать рекомбинанты по участкам вблизи *SD*. Результаты таких исследований показывают, что в правом плече хромосомы II есть локус, присутствие которого существенно для действия *SD*. Этот локус лежит около *SD*, но находится дальше от центромера. Это *активатор SD*, *Ac(SD)*. Для того чтобы функционировать, этот локус должен нахо-

даться
SD —
то небо
измене
ном —
особь
перестр
щей *SD*
ходит п
SD, а н
Соот
искажен
щеплени
по *SD* с
ваний с
то, что
Х-хром
у искаж
получаю
жающий
с раздел
скрещив
неизмене
неизмене
Половин
ринскую
рей, полу
ление не
из этих д
скую Х-
Самки. д
вина, наз
неизвесте
Случа
(L. Sandl
генетичес
ген *St* (*S*
прекрасн
Перво
не наблю
шению пе
некоторой
мосома, в
инбридин
нению алл
сий и друг
зиготном с
довательно
мейотическ
ных попул
торых отн
ЭПИСОМЫ
Известны с
няется пот
Такие эффе
2. И. Гершков

даться в цис-положении по отношению к SD . Частота перекреста в области $SD - Ac(CD)$ оказывается пониженной; полагают, что здесь есть какая-то небольшая перестройка. Обычно $SD - Ac(SD)$ вызывает генетическое изменение в соответствующем ему — предположительно неперестроенном — сегменте $SD+$ гомологичной хромосомы. Однако можно образовать особь с одной хромосомой II, содержащей почти всю предполагаемую перестройку, за исключением SD , и с гомологичной хромосомой, содержащей SD , $Ac(SD)$ и сегмент неперестроенного участка. В этом случае происходит искажение расщепления, направленное против хромосомы, несущей SD , а не получаемое обычно искажение против ее гомолога.

Соотношение в F_1 обычных гетерозиготных по SD самцов оказывается искаженным (*отец искажает расщепление или проявляет искажение расщепления через свое потомство*), но этого не происходит в F_1 гетерозиготных по SD самок. Самец SD/SD^+ может исказить расщепление и при скрещивании с самкой, обладающей сцепленными X-хромосомами. Поразительно то, что сыновья такого самца, содержащие SD (получившие отцовскую X-хромосому), не искажают расщепления. Получается, что X-хромосома у искажающего расщепление самца оказывается в таких условиях, что получающие ее сыновья уже не могут исказить расщепление. Если искажающий расщепление самец скрещивается с неродственной самкой SD^+/SD^+ с раздельными X-хромосомами, то все содержащие SD сыновья от такого скрещивания могут исказить расщепление, так как они получают по одной неизменной материнской X-хромосоме. (Отметим, что дочери имеют одну неизменную материнскую и одну измененную отцовскую X-хромосому.) Половина несущих SD сыновей от дочерей получает неизменную материнскую X-хромосому; они могут исказить расщепление; сыновья дочерей, получающие измененную отцовскую X-хромосому, исказить расщепление не могут. Все несущие SD сыновья от скрещиваний самцов любого из этих двух типов с самками SD^+/SD^+ получают неизменную материнскую X-хромосому и, следовательно, могут исказить расщепление. Самки, дающие сыновей, несущих SD , из которых искажают лишь половина, называются *условно искажающими*. Механизм условного искажения неизвестен.

Случай с геном SD напоминает уже рассмотренный пример $Ac - Ds$ (L. Sandler a. I. Hiraizumi, 1961). Ген SD вызывает определенного типа генетическое изменение, регулируемое $Ac(SD)$. Активность SD меняет ген $St(SD)$; на нее влияет также X-хромосома. SD представляет собой прекрасный пример генетического контроля мутабельности.

Первоначально SD был обнаружен в природной популяции, у которой не наблюдалось искажения, так как воздействие SD , приводящее к нарушению передачи потомству гомологичной хромосомы, было подавлено некоторой совокупностью факторов. Одним из таких факторов была X-хромосома, в которой способность исказить расщепление поддерживалась инбридингом. В этой популяции отбор, естественно, способствовал сохранению аллелей SD^+ , устойчивых к искажению, а также сохранению инверсий и других структурных перестроек, затрагивающих IR : ведь в гетерозиготном состоянии такие перестройки препятствуют конъюгации и, следовательно, уменьшают искажение расщепления. Ген SD служит примером *мейотического дрейфа*, который способен изменять частоту генов в природных популяциях в результате образования функциональных гамет, в которых отношение сегрегантов отличается от соотношения 1:1.

ЭПСОМЫ И ВИРУСЫ КАК МУТАГЕНЫ

Известны случаи, когда фенотипический эффект подавляется или изменяется потому, что гетерохроматин оказывается рядом с эухроматином. Такие эффекты положения часто возникают после структурных перестроек

у дрозофилы. Иногда в подавлении фенотипического выражения участвуют специальные генетические элементы, связанные с гетерохроматизмом, например, ген искажения расщепления у дрозофилы или ген диссоциации у кукурузы. Некоторые из этих генетических факторов способны вызывать разрыв хромосомы и менять свое место в геноме. По некоторым своим свойствам эписомы близки к этим факторам и поэтому следует сопоставить механизмы, с помощью которых они подавляют фенотипическое выражение, влияют на движение органелл и разрывы хромосом.

Для многих аллелей самых разных маркеров у *Salmonella* известна частота спонтанного мутирования из ауксотрофов в прототрофы. Если ауксотрофную бактерию инфицировать трансдуцирующим фагом, выросшим на той же генетической линии или том же штамме бактерий, но с децией (нехваткой) в исследуемом гене, то частота появления прототрофов заметно возрастает (M. Demerec, 1963; A. Taylor, 1963). Гены, реверсия которых к прототрофности индуцируется таким способом, называли *селферами* (self — сам, себя). Наличие трансдуцирующего фрагмента, который конъюгирует с участком вблизи гена-селфера, стимулирует каким-то образом мутабельность селфера, но полностью механизм реверсии пока неизвестен. Таким образом, фаг усиливает мутабельность бактериальных генов. Мы уже видели (стр. 387), что мутабельность внеядерного гена контролируется генами ядра.

В связи с этим нужно отметить следующие результаты, полученные на высших животных, в том числе и на человеке.

1. Внесение вируса саркомы Рауса в культуру нормальных клеток крысы приводит к увеличению частоты хромосомных разрывов по сравнению с контролем.

2. После инокуляции вируса герпеса в культуру установившейся линии клеток человека учащаются разрывы хромосом.

3. У всех больных корью на 5-й день после появления сыпи в лейкоцитах обнаруживают большое количество хромосомных разрывов. Разрывы хромосом происходят в 33—72% исследованных клеток, причем наблюдаются поломки всех хромосом и во многих местах. В то же время соединение разорванных концов, которое приводит к структурным перестройкам, происходит с малой частотой (W. Nichols и др., 1962).

4. После заражения культуры клеток человека обезьяньим вирусом SV₄₀ появляется большое количество хромосомных мутаций, в том числе дицентрики, кольца и (возможно) транслокации. Частоты повреждения разных хромосом явно отличаются от случайных (P. Moorhead и E. Saksela, 1963). По крайней мере семь других вирусных инфекций человека связаны с увеличением перестроек различных хромосом в лейкоцитах.

Мы не знаем, чем вызваны эти эффекты. Они могут быть или следствием влияния на метаболизм присутствия, функционирования или репликации нуклеиновых кислот вируса, или проявлением специфических свойств этих вирусов, близких к свойствам эписом или же эффектам какого-то другого фактора или сочетания факторов. В любом случае, вирусы могут индуцировать мутации в клетках высших организмов как *in vivo*, так и *in vitro*. Возможно, что к этому способны и присутствующие обычно внеядерные гены. Поэтому ясно, что в генетическом контроле мутабельности участвуют как внеядерные гены, эписомы, так и обычные хромосомные гены. Гипотетически каждый из них способен влиять как на свою собственную мутабельность, так и на мутабельность других генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Контроль со стороны генотипа над процессами митоза и мейоза препятствует появлению спонтанных геномных мутаций или мутаций, затрагивающих целые хромосомы. Структурные перестройки хромосом подавляют

ся тем
лиров
В неко
немны
хромос
регул

На
темпер
что ген
На это
щих ра
и транс
генов,
регуля
ции. В
разрыв

ВОПРОСЫ

- 30.1. с мутаб
- 30.2. считать
- 30.3. ций, то
- 30.4. щие при
- генетичес
- 30.5. вызвана
- бильные
- 30.6. эписомы
- 30.7. циях дро
- 30.8. агент, по
- 30.9. 30.10.
- увеличен

ЛИТЕРАТУРА

- M. Demerec.
G. E. Magn
Sci. US
B. McClintoc
Sci. US,
B. McClintoc
Biol., 19
P. S. Moorh
formed H
W. W. Nich
Breakage
P. A. Peterso
L. Saudler an
gaster. VI
Canad. J.
A. L. Taylor.
Sci. US.,

ся тем, что синапсис и перекрест происходят очень точно. Такое контролирование возможно потому, что гены в хромосоме расположены линейно. В некоторых случаях, в том числе при образовании полиплоидных и поли-
номных хромосом и при образовании нескольких моноцентрических хромосом из одной полицентрической, генетические изменения также регулируются генотипом.

Наличие общего контроля над мутационной реакцией на изменение температуры и на действие мутагенных агентов свидетельствует о том, что генотип регулирует также и частоту возникновения точечных мутаций. На это указывает также существование генов-мутаторов и генов, вызывающих разрывы хромосом, которые приводят к появлению нехваток, сдвигов и транспозиций и, как следствие этого, к эффектам положения. Действие генов, вызывающих разрывы и другие мутации, контролируют гены-регуляторы. Трансдуцирующие фаги могут индуцировать точечные мутации. Вирусы, поражающие высших животных, также могут вызывать разрывы хромосом.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

30.1. Каким образом точность процессов митоза и мейоза связана с мутабельностью генетического материала?

30.2. Защитите утверждение, согласно которому митоз и мейоз нельзя считать свойствами, внутренне присущими генам.

30.3. Если изменения всего генома составляют отдельный класс мутаций, то следует ли считать мутациями изменения ploидности, происходящие при гаметогенезе и оплодотворении? Почему?

30.4. Свидетельствует ли активность локуса «диссоциации» о наличии генетического контроля над мутабельностью? Объясните.

30.5. На каком примере можно показать, что мозаичность не всегда вызвана действием отдельной пары генов, у одного из которых есть нестабильные аллели?

30.6. Какие свойства локуса «диссоциации» напоминают свойства эписомы F?

30.7. Обсудите механизмы, посредством которых в природных популяциях дрозофилы подавляется искажение расщепления.

30.8. Обсудите гипотезу, согласно которой в феномене SD участвует агент, подобный эписоме.

30.9. Чем SD похож на Ds и чем отличается от него?

30.10. Полагаете ли Вы, что все вирусы вызывают значительное увеличение частоты хромосомных разрывов? Объясните.

ЛИТЕРАТУРА

- M. Demerec. Selfer Mutants of *Salmonella typhimurium*.—Genetics, 1963, 48, 1519—1531.
G. E. Magni. The Origin of Spontaneous Mutations during Meiosis. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1963, 50, 975—980.
B. McClintock. The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize.—Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1950, 344—355.
B. McClintock. Controlling Elements and the Gene.—Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1956, 21, 197—216.
P. S. Moorhead and E. Saksela. Non-Random Chromosomal Aberrations in SV₄₀-Transformed Human Cells.—J. Cell. Comp. Physiol., 1963, 62, 57—83.
W. W. Nichols, A. Levan, B. Hall and Östergren. Measles-Associated Chromosome Breakage, Preliminary Communication.—Hereditas, 1962, 48, 367—370.
P. A. Peterson. The Pale Green Mutable System in Maize.—Genetics, 1960, 45, 115—133.
L. Saudler and Y. Hiraizumi. Meiotic Drive in Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. VIII. A. Heritable Aging Effect on the Phenomenon of Segregation-Distortion —Canad. J. Genet. Cytol., 1961, 3, 34—96.
A. L. Taylor. Bacteriophage — Induced Mutation in *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. US., 1963, 50, 1043—1051.

Глава 31

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МУТАЦИЙ

Частота спонтанного мутирования определяется такими встречающимися в природе физическими мутагенами, как ультрафиолетовые лучи, ионизирующая радиация (глава 13); по-видимому, сюда относятся и химические мутагены (глава 14). Мутабельность также подчиняется генетическому контролю (глава 30). Обнаружение корреляции между мутагенностью и длиной волны ультрафиолетовых лучей позволяет предполагать, что в мутационный процесс вовлекаются нуклеиновые кислоты (стр. 276). Каковы молекулярные основы спонтанного и индуцированного мутирования?

МУТАГЕНЫ И АНТИМУТАГЕНЫ

Найдено, что у *E. coli*, ауксотрофной в отношении триптофана, частота спонтанного мутирования от чувствительности к устойчивости по отношению к инфицированию фагами T5 и T6 зависит от того, какой из компонентов питательной среды оказывается ограничивающим рост фактором (A. Novick and L. Szillard, 1951). Наиболее высокая частота получена в случае, когда фактором, контролирующим рост, оказывается триптофан, самая низкая частота наблюдается, если таким фактором оказывается лактат.

Такой результат показывает, что частота возникновения спонтанных мутаций зависит от физиологического или биохимического состояния организма. Эта точка зрения подтверждается также данными о влиянии изменений температуры на частоту спонтанного мутирования (стр. 206). Все это позволяет предполагать, что химические вещества, добавленные к культуре *E. coli*, которая растет в среде, содержащей ограниченное количество одного из существенных факторов роста, могут обнаруживать выраженный мутагенный эффект.

При использовании различных веществ в концентрациях, не вызывающих заметной гибели триптофан-зависимых бактерий, было обнаружено, что многие *пурины и их производные мутагенны*. Наиболее мутагенным оказался кофеин; почти столь же эффективен теофиллин; мутагенным действием обладает азагуанин и в меньшей степени аденин. В отличие от них пиримидины и их производные в тех же условиях не мутагенны. Если к среде, содержащей любой из пуриновых мутагенов, добавлены пуриновые рибозиды (аденозин или гуанозин), мутагенная активность оказывается полностью подавленной (A. Novick, 1956). Так, аденозин полностью подавляет мутагенность аденина и кофеина. Ясно, что *пуриновые рибозиды* действуют как *антимутагены*, подобно тому, как аноксия и каталаза антимутагенны для X-лучей, вызывающих хромосомные поломки (стр. 196) или точечные мутации (стр. 206), и их нельзя рассматривать как агенты, селективно действующие на индуцированные мутанты. С другой стороны, пиримидиновые рибозиды, а также дезоксиаденозин и дезоксигуанозин, либо вообще не проявляют антимутагенного действия в отношении пуринов и их производных, либо значительно менее эффективны, чем пуриновые рибозиды.

Теофиллин обладает мутагенностью только в аэробных условиях. У бактерий, растущих анаэробно, в значительных концентрациях накоп-

ливается
ливается
вается, с
противод
условия
ультраф
только в
согласует
зывает а
или γ-лу

Частот

новых р
рибозидов
спонтанно
исходной
в условия
ожидаемом
метаболиз
мутагены
чивости, ч
чений хар

Привед

пуринов и
Можно пол
две трети
воздействи
нормально
пурины, их
Эти данные
циям, в час
что такие
от пиримид
тельными н
динам.

Несмотр
и их рибози
считать обо

1. Знач
вследствие
мутагены и

2. Суще
нуклеиновы

Несмотря
частоты мут
эффекте, выз
в тимине ба
непрямой св

МУТАЦИОННЫЕ

При обсужде
карты фага
спонтанно воз
из 300 разны
что некоторы
событиях бол

ливается аденозин, тогда как у бактерий, растущих аэробно, он не накапливается в заметных количествах. В анаэробных условиях аденозин оказывает, очевидно, нормально присутствующим антимутагеном, который противодействует эффекту добавленных в среду пуринов. Отметим, что условия анаэробного роста не влияют на частоту мутаций, индуцируемых ультрафиолетовыми лучами, и делают X-облучение менее эффективным только вследствие уменьшения концентрации кислорода; такой вывод согласуется с данными, показывающими, что избыток аденозина не оказывает антимутагенного действия при облучении ультрафиолетовыми или γ -лучами.

Частота спонтанного мутирования уменьшается в присутствии пуриновых рибозидов (аденозина или гуанозина), но не пиримидиновых рибозидов (уридина или цитидина). В присутствии аденозина частота спонтанного мутирования уменьшается примерно на одну треть от ее исходной величины. Кроме того, частота появления спонтанных мутаций в условиях анаэробного культивирования снижается, что соответствует ожидаемому на основании данных об образовании аденозина в процессе метаболизма и об отсутствии его использования. Наконец, все пуриновые мутагены с большей частотой вызывают появление мутаций к T5-устойчивости, чем к T6-устойчивости, хотя для ультрафиолетового и γ -облучений характерна обратная картина.

Приведенные данные позволяют различать два рода мутагенов — типа пуринов и типа радиации — ведущих к образованию мутантов двух типов. Можно полагать, что в описанных экспериментальных условиях примерно две трети спонтанно возникающих мутантов образуется в результате воздействия какого-то вещества типа пурина, синтезируемого в ходе нормального клеточного метаболизма. Не совсем ясно, почему только пурины, их аналоги и пуриновые рибозиды влияют на частоту мутаций. Эти данные, однако, можно отнести только к некоторым изученным мутациям, в частности к мутациям устойчивости к фагам T5 или T6. Возможно, что такие мутации оказываются более зависимыми от пуринов, нежели от пиримидинов, тогда как другие мутации могут оказаться нечувствительными к пуринам и относительно более чувствительными к пиримидинам.

Несмотря на отсутствие ясности в вопросе о том, каким образом пурины и их рибозиды вызывают мутагенный и антимутагенный эффекты, можно считать обоснованными два основных вывода:

1. Значительная часть спонтанно возникающих мутаций возникает вследствие нормальной биохимической активности клеток, образующих мутагены и антимутагены.

2. Существует некая связь между частотой мутирования и метаболизмом нуклеиновых кислот.

Несмотря на то, что имеются лишь данные о непосредственной связи частоты мутирования с пуринами и их рибозидами, данные о мутагенном эффекте, вызываемом отсутствием тимина в среде, где растут нуждающиеся в тимине бактерии, позволяют предположить о существовании также не прямой связи с ДНК и ее предшественниками.

МУТАЦИОННЫЙ СПЕКТР

При обсуждении генетических особенностей области *rII* генетической карты ффага T4 указывалось (стр. 358), что примерно 1500 изученных спонтанно возникших мутантов несут изменения в одном или в нескольких из 300 разных сайтов области *rII*. При этом подразумевается, конечно, что некоторые мутационные сайты должны участвовать в мутационных событиях более одного раза. Наблюдается значительная вариабельность

частоты участия различных сайтов в мутационных событиях. По отношению к ДНК такая вариабельность должна означать, что отдельные нуклеотиды или группы нуклеотидов подвергаются спонтанному мутированию чаще, чем другие, и, следовательно, должны существовать мутационные «горячие участки».

Рекомбинационные исследования позволяют анализировать область r^{II} на уровне нуклеотидов; при этом ДНК фага Т4 можно использовать в качестве модели для исследований, направленных на выяснение молекулярных основ мутаций. Следует указать, что Т-четные фаги (Т2, Т4, Т6) содержат в ДНК 5-оксиметилцитозин (рис. 19—3) или его производные вместо цитозина; во всех других отношениях ДНК этих фагов следует считать типичной ДНК. Ранее уже указывалось (стр. 296), что 5-бром урацил (рис. 21—4) может замещать тимин (и только тимин) при синтезе ДНК *in vitro*. Приведет ли включение 5-бром урацила в ДНК фага Т4 к мутационным последствиям? ¹

Добавление 5-бром урацила к нормальной культуральной среде, в которой выращивают *E. coli* перед инфицированием ее фагом Т4, не обязательно приведет к включению этого аналога основания в ДНК Т4 после инфицирования, так как тимин, синтезированный бактерией, может быть предпочтен его аналогу при синтезе ДНК фага. Сульфаниламид, как таковой, не будучи мутагеном, подавляет синтез фолиевой кислоты, которая в восстановленной форме (тетрагидрофолиевая кислота) необходима для ферментативных реакций метилирования. Поэтому для подавления синтеза тимина из урацила к культуральной среде добавляют сульфаниламид. Среда, в которую добавлены различные необходимые химические вещества, уже содержащие метильные и оксиметильные группы, не содержит, однако, дезоксирибонуклеотидов тимина или 5-оксиметилцитозина. (Дезоксирибонуклеотид 5-гидроксиметилцитозин исключается для предотвращения его возможного превращения в аналог тимина, который может быть включен предпочтительнее, чем 5-бром урацил.) Бактерия при этом сохраняет способность функционировать в качестве реципиента фага.

В таких условиях 5-бром урацил оказывается высоко мутагенным для области r^{II} . Сравнительное изучение r^{II} мутантов, индуцированных 5-бром урацилом и встречающихся спонтанно, позволило обнаружить, что индуцированные мутанты также встречаются группами на генетической карте, хотя «горячие участки» для тех и других мутаций локализованы в различных положениях. Кроме того, в отличие от спонтанных мутантов, очень немногие из индуцированных мутантов несут большие мутации (межнуклеотидного типа) и, следовательно, почти все способны давать обратные мутации r^{+} или близкого к r^{+} фенотипа.

Спектры мутантов (стр. 206), полученных при воздействии 5-бром урацилом или другими химическими мутагенами, и спонтанных мутантов на нуклеотидном уровне сильно отличаются; однако точная химическая основа индуцированных мутаций не установлена с какой-либо определенностью, так как любой из мутагенов способен вызывать соответствующий эффект, используя в разных случаях несколько отличные метаболические процессы. Совершенно очевидно, что молекулярные основы мутагенного действия лучше изучать при использовании самых кратчайших из возможных физических процессов между химическим мутагеном и геном (I. Nersisyan, 1955). Так, лучше обработать химическим мутагеном спермию, а не яйцеклетку, или подвергнуть непосредственному воздействию мутагеном фаг или трансформирующую ДНК, а не действовать непрямым способом через хозяина.

¹ Дальнейшее изложение основано главным образом на работах С. Бензера и И. Фриза (1958) и последующих исследованиях И. Фриза и соавторов.

МУТАЦИЯ.
ЗАТРАГИВ.

Поскольку
тидов, рас
мутации.
ченны, заме
положение
новой кисл
ем инверси
лоты, так
Изменения
разрыва по
перестанов

Разрыв
сти действ
после обра
либо потер
«старого»
Единичные
скими мута
кулы так
внедриться
(I. I. Lerman
собна разд
в качестве
молекулой
также веро
встречающе
Такой меха
и новых н

В прису
меразой на
ботидов и
конечно, в
5'-трифосфа
плементарн
высоко мут
такое вклю

СУБПУКЛЕО

Мутации м
основание.
определяем
случайного

МУТАЦИЯ

ЗАТРАГИВАЮЩАЯ ЦЕЛЫЙ НУКЛЕОТИД

Поскольку генетический материал представлен линейным рядом нуклеотидов, рассмотрим возможность изменения целых нуклеотидов как основы мутации. Один или несколько нуклеотидов могут быть добавлены, утрачены, замещены, переставлены в случае инверсии или перемещены в новое положение с инверсией или без нее. По-видимому, в однонитчатой нуклеиновой инверсии, которая должна произойти в обеих нитях нуклеиновой кислоты, так как в противном случае не сохраняется полярность нитей. Изменения, касающиеся целых нуклеотидов, могут возникать в результате разрыва полинуклеотидного остова в двух или более местах с последующей перестановкой фрагментов.

Разрыв остова (и потеря дезоксирибонуклеиновой кислоты способностью действовать в качестве затравки-матрицы) наблюдается особенно часто после обработки ионизирующим физическим мутагеном и сопровождается либо потерей (делецией), либо перераспределением уже сформированного «старого» генетического материала (Н. Hargington, 1964; С. Mead, 1964). Единичные изменения целых нуклеотидов могут быть вызваны химическими мутагенами, при действии которых не происходит разрывов. Молекулы таких химических мутагенов, как *акридины* (рис. 31-1), могут внедриться между следующими друг за другом нуклеотидами нити ДНК (L. Legman, 1963). Одна добавляемая молекула химического мутагена способна раздвинуть нить продольно на 3,4 Å. Если такая цепь используется в качестве матрицы, то к комплементарной цепи в положение, занимаемое молекулой мутагена, может быть добавлен целый нуклеотид. Существует также вероятность, что добавление свободного нуклеотида или другого встречающегося в природе вещества может вызвать такой же результат. Такой механизм мутагенеза предусматривает изменение как старых, так и новых нитей ДНК.

В присутствии Mn^{++} комплементарная нить, образуемая ДНК-полимеразой на ДНК-матрице *in vitro*, представляет собой смесь дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов [Р. Berg и соавторы (см. ссылки на стр. 305)], если, конечно, в качестве субстратов присутствуют соответствующие рибозид-5'-трифосфаты. Можно ожидать, что и включение урацила и рибозы в комплементарную нить приведет к возникновению мутации. Соли марганца высоко мутагенны для бактерий (М. Demeges и соавторы); очевидно такое включение может происходить и *in vivo*.

СУБНУКЛЕОТИДНЫЕ МУТАЦИИ

Мутации могут затрагивать в составе нуклеотидов углевод, фосфат или основание. Хотя дезоксирибоза представляет собой единственный сахар, определяемый в ДНК микроорганизмов, нельзя исключить вероятность случайного включения рибозы в ту или иную типичную нить ДНК. Рибоза

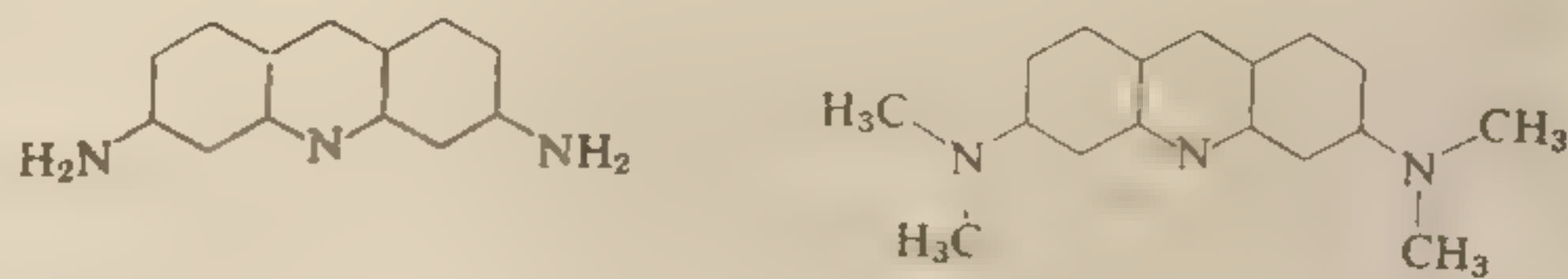


РИС. 31-1.

Два акридиновых красителя: слева — профлавин, справа — акридиновый оранжевый

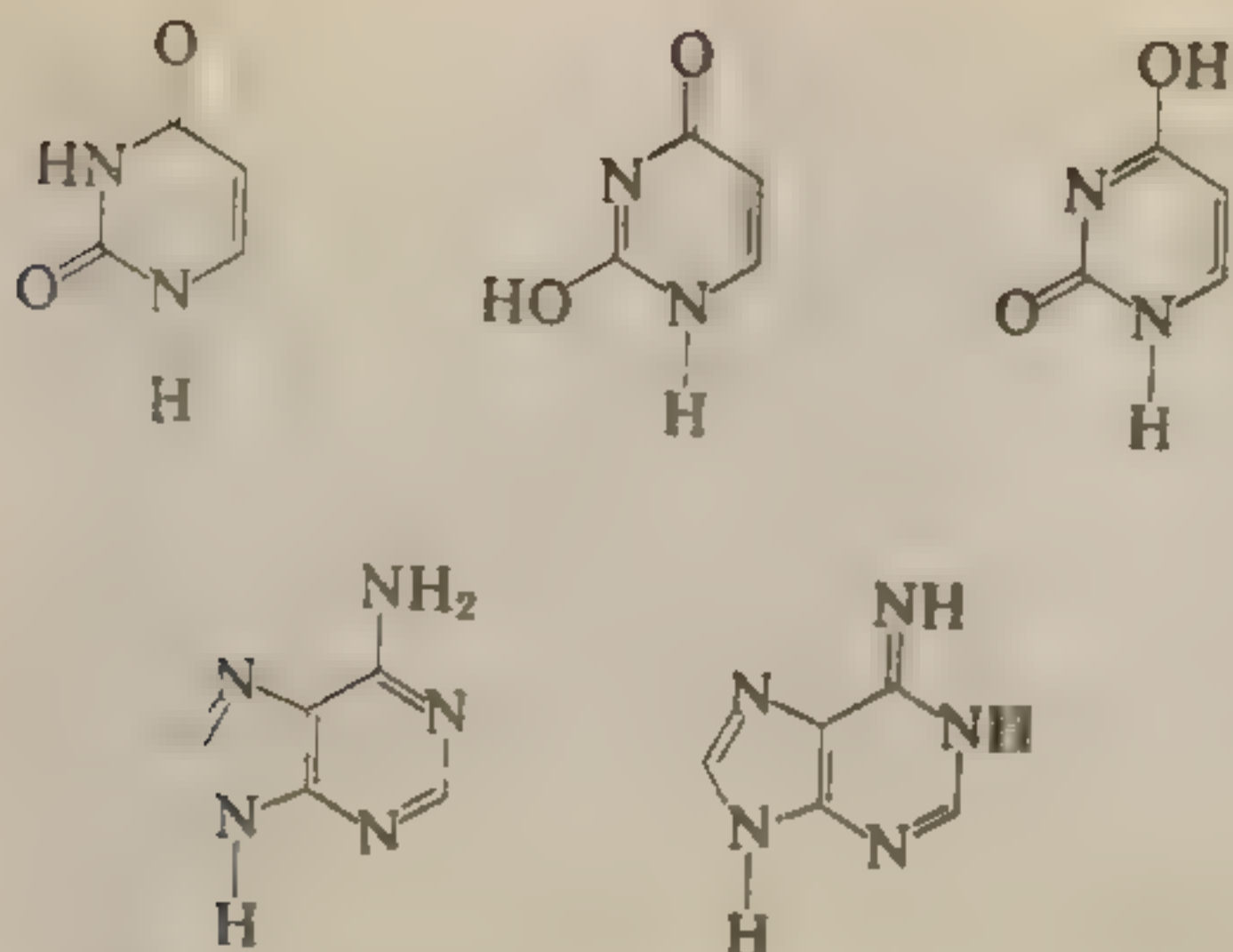


РИС. 31-2.

Таутомеры урацила (вверху) и аденина (внизу)

может быть частью цепи ДНК, синтезированной *in vitro*, если целые рибонуклеотиды включаются в нее способом, описанным в предшествующем разделе. Показано, что в ДНК клеток млекопитающих в культуре ткани может включаться арабиноза. Ранее уже указывалось на отсутствие данных о мутагенном действии рибозидов на ДНК; иногда пуриновые рибозиды проявляют антимутагенное действие. Тем не менее, нельзя исключить вероятность того, что некоторые агенты действуют как мутагены, присоединяя атом кислорода в положение 2'-дезоксирибозы в уже образованной последовательности ДНК или удаляя 2'-О-рибозы.

Фосфат нуклеотида может быть изменен в результате замещения Р на P^{32} . Если однонитчатая ДНК таких вирусов, как фХ174 и ф-13, включает P^{32} , то для ее инактивации достаточно одного радиоактивного распада P^{32} до S. С другой стороны, для инактивации фага Т2 и подобных ему фагов, содержащих двунитчатую ДНК, требуется около 10 радиоактивных распадов. Одно из простых объяснений таких «самоубийственных экспериментов» сводится к тому, что каждый распад разрывает остов полинуклеотида, в котором он происходит, причем один распад в остове одной цепи иногда ведет к разрывам поблизости в остове комплементарной нити, если таковая имеется. Такого рассечения одно- или двунитчатой ДНК (или предположительно РНК) достаточно для инактивации нуклеиновой кислоты.

Изменения оснований в старых генах. Рассмотрим далее изменения, затрагивающие основания нуклеотида. Мы уже видели, что изменение основания может произойти в результате замены одного целого нуклеотида на другой. Выясним теперь возможности химического изменения основания, которое уже представляет собой часть нуклеотида в генетической последовательности.

Определенные атомы в каждом из оснований в ДНК и РНК могут находиться в нескольких различных положениях; иными словами, каждое основание может существовать в нескольких *таутомерных формах*. Ранее мы допускали, что наиболее вероятная таутомерная форма каждого основания — это его кето- (O) или амино- ($-NH_2$) форма. В альтернативных таутомерах урацила и аденина, показанных на рис. 31—2, различны те положения, в которых присоединен атом водорода. Менее обычные таутомеры существуют в енольной ($-OH$) или имино- ($=NH$) форме. Обычный амино-таутомер аденина спаривается с тиминном; однако один из его менее обычных имино-таутомеров может спариваться и с цитозинном (рис. 31—3). В свою очередь, редкий имино-таутомер цитозина может спариваться с аденином, образуя две Н-связи. Редкий енольный таутомер тимина может спариваться с гуанином, образуя три Н-связи, и та же пара Т:Г может образоваться, если в необычном таутомерном состоянии находится пурин. Следовательно, в каждом из этих случаев таутомерное изменение делает возможной новую комбинацию пуриновых и пиримидино-

ых оснований (J. Watson a. F. Crick, 1953c, ссылки к главе 20). Таутомерные изменения могут играть важную роль в спонтанном мутагенезе. Относительная частота встречаемости различных таутомерных альтернатив зависит от ряда факторов, включая pH. Необычные пары оснований (А : Ц и Т : Г) могут также встречаться после облучения какого-либо одного из оснований.

Химические изменения в старых основаниях могут также встречаться после обработки химическими мутагенами. Азотистая кислота (HNO_2) является мутагенной в отношении вируса табачной мозаики, фагов Т2 и Т4, бактерий, дрожжей и трансформирующей ДНК. Этот мутаген отделяет NH_2 от пуринов и пиримидинов ДНК и РНК, т. е. дезаминирует их. Дезаминированный аденин представляет собой гипоксантин (см. рис. 21—4), (который затем спаривается с Ц); дезаминированный цитозин превращается в урацил (который затем спаривается с А); дезаминированный гуанин становится ксантином (который все же спаривается с Ц, но только двумя Н-связями).

При низком pH у фага Т4 образуются точечные мутации. In vitro высокая концентрация водородных ионов вызывает депуринизацию (полное удаление всех Г и А), что ведет к образованию апуриновой кислоты. При восстановлении высокого pH может произойти разрыв остова апуриновой кислоты. Точечные мутации, образуемые у фТ4 при низких pH, вероятно, вызваны либо неправильным замещением оснований, либо образованием комплекса с комплементарным, выводимым из ДНК нуклеотидом.

Поглощение нуклеиновой кислотой ультрафиолетовых лучей (УФ) зависит главным образом от присутствия хромофорных групп (особых групп, содержащих двойные связи). При обработке свободных оснований ультрафиолетовыми лучами, пиримидины более подвержены химическим изменениям, чем пурины. Одним из обычных изменений оказывается присоединение воды к двойной связи между атомами углерода 4 и 5 пиримидинов. Такой фотопродукт, полученный для цитозина, показан на рис. 31—4, А. Хотя фотопродукт цитозина способен снова превратиться в исходный цитозин при нагревании или подкислении, он может встречаться достаточно часто in vivo, ослабляя Н-связи между Ц и Г, в результате чего возникают локализованные зоны разделения нитей, или денатурация. Подтверждением такой точки зрения служит тот факт, что УФ разрушает Н-связи в нативной двунитчатой ДНК.

Ультрафиолетовые лучи изменяют молекулу тимина в том же положении, что и молекулу цитозина, вызывая разрыв двойной связи 4-5; в этом случае две молекулы тимина образуют димер [рис. 31—4, В]. Полагают, что инициируемое ультрафиолетовыми лучами гидрирование Ц, ослабляющее Н-связи между Ц и Г, увеличивает вероятность димеризации Т. Димеры тимина образуются не только между молекулами тимина, расположенными на разных нитях, в результате чего образуются поперечные связи между нитями ДНК, но также между соседними Т на одной и той же нити. (Межнитевые связи образуются также в результате действия антибиотика митомицина С, обладающего мутагенным действием). Межнитевая димери-

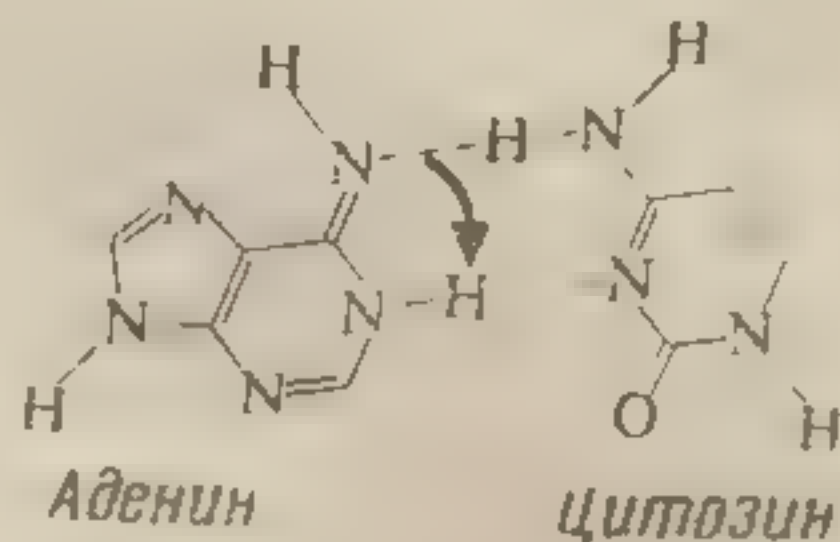
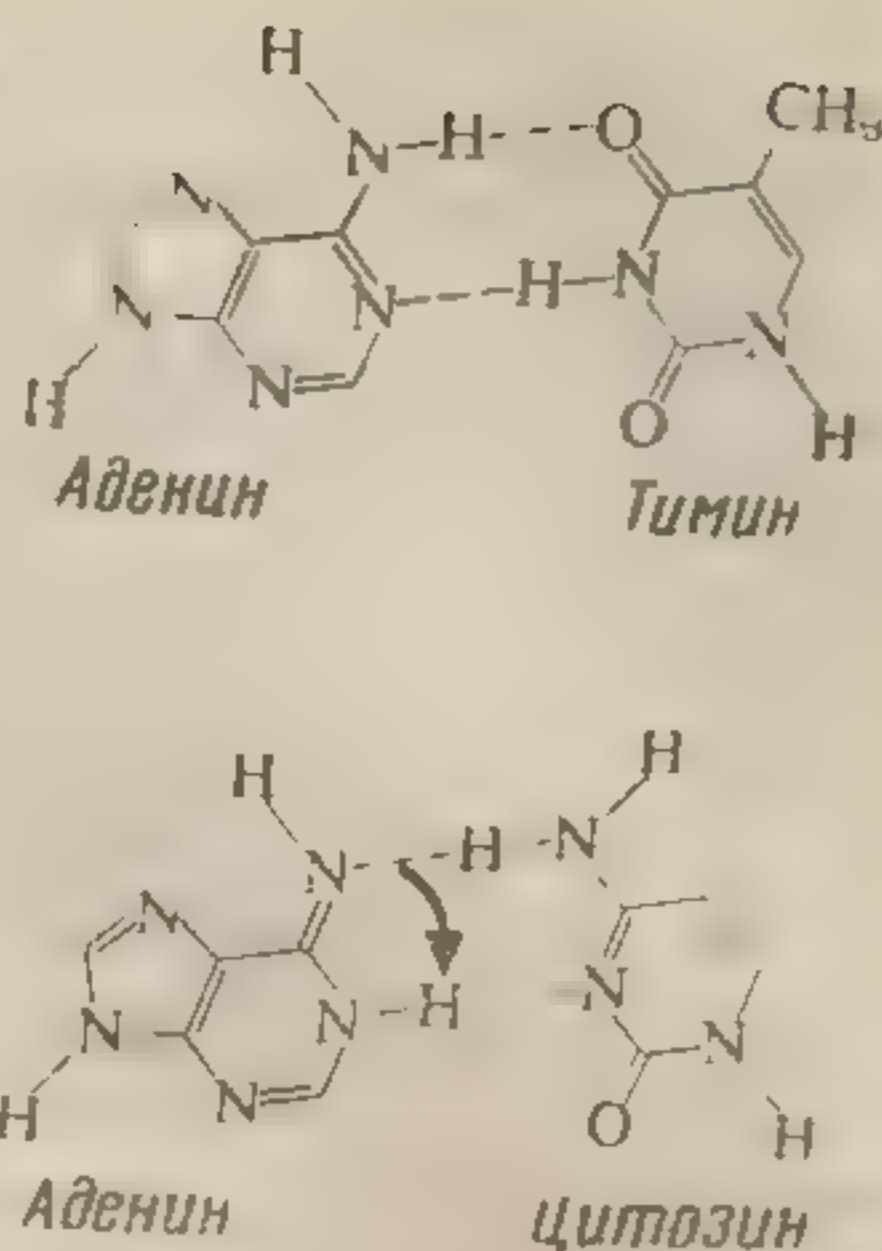


РИС. 31-3.

Таутомерное изменение аденина, способное вызвать замену комплементарного аденину основания тимина на цитозин.

Верхняя схема показывает аденин до того, как произошло таутомерное перемещение одного из его водородных атомов. Нижняя схема показывает результаты такого перемещения. (По Д. Уотсону и Ф. Крику)

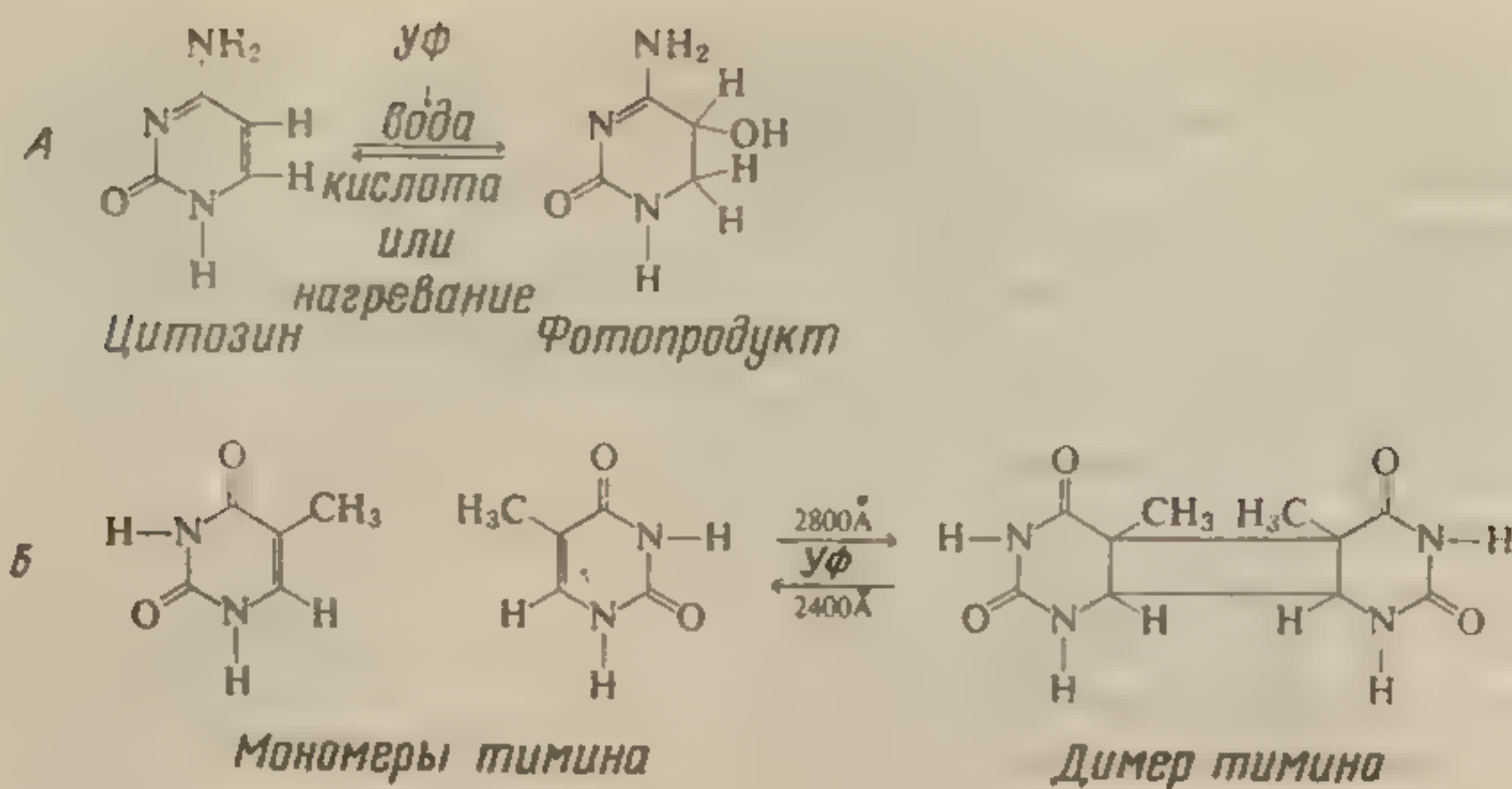


РИС. 31-4.

Влияние ультрафиолетового облучения на пиримидины ДНК. Показаны атомы водорода, присоединенные к кольцу углеродных атомов

зация предотвращает разделение цепи и блокирует репликацию, тогда как внутринитевая димеризация препятствует правильному спариванию оснований Т и А, приводя в конечном счете к образованию неправильных комплексов. Факт димеризации позволяет объяснить, каким образом УФ нарушает активность однонитчатой ДНК как затравки и матрицы, вызывает появление мутаций у фага Х174 и нарушает активность трансформирующей ДНК. Однако облучение УФ способно вызвать два противоположных эффекта в зависимости от используемых длин волн: при облучении УФ лучами с длиной волны 2800 Å наблюдается тенденция к образованию димеров из мономеров, тогда как при длине волны 2400 Å наблюдается тенденция к образованию мономеров из димеров. ДНК, лишенная затравки-матрицы при облучении УФ с длиной волны 2800 Å, частично восстанавливает свою активность при последующем облучении УФ с длиной волны 2390 Å. При больших дозах УФ с длиной волны 2800 Å примерно 50% биологической инактивации (по измерению трансформирующей способности) может быть приписано образованию Т-димеров, причем одно инактивирующее «попадание» эквивалентно образованию одного димера на каждые 160 нуклеотидов (R. а. J. Setlow, 1962).

Образование внутринитевых димеров и последствия этого процесса для репликации могут быть изучены *in vitro* (R. Setlow и др., 1963). После того как различные однонитчатые ДНК, используемые в качестве затравки-матрицы, подвергнуты обработке лучами с длиной волны 2800 Å, продукты синтеза подвергают «анализу ближайшего соседствования». Как и ожидалось, частота последовательностей АА уменьшается соответственно частоте димеризации последовательностей ТТ; увеличивается частота динуклеотидных последовательностей, содержащих Г, особенно ГГ. Эти результаты свидетельствуют о том, что Т-димеры *in vivo* уменьшают вероятность включения комплементарной АА последовательности против ТТ последовательности в матрице и позволяют предполагать, но не доказывают, что эти АА последовательности часто замещаются на ГГ.

Как это уже указывалось, *фотовосстановление* димеров, индуцированных УФ, наблюдается после обработки УФ лучами с меньшей длиной волны. В присутствии видимого света с определенными длинами волн (синего света) была обнаружена специфическая ферментативная система, способная вызвать распад Т-димеров, включая межнитевые димеры, до мономеров. Происходит так называемое *хемфотовосстановление* (стр. 206). Поскольку восстановление после обработки мутагенной дозой УФ состав-

ляет тол
другими
могут вы
ставляет

Несме
и *in vivo*
облучени
ноте. Так
нии тимин
низма уда
в кислото
который
в не раство
(R. Setlow
лагать, что
чивых кле
согласно
а. Р. Нов
должен им
следует ук
вообще воз
урацила.
к РНК бла

Таутоме
рН могут п
го пурина
(Т ↔ Ц) по
пиримидин
гии И. Фри
быть возмо

Какова
и трансверс
ном может с
А' определя
но, определ

В резуль
определяет
случае про
пара Г:Ц
деляет А в
ходит также
Если А
то в целом р
сия.

РИС.

Предп
вател
душим
транс

ляет только около 50%, то УФ, вероятно, вызывает образование мутаций другими способами, нежели образование димеров. Так, большие дозы УФ могут вызвать разрыв в остоле ДНК *in vitro*; этот эффект, вероятно, и представляет собой другой способ образования мутаций *in vivo*.

Несмотря на то, что тиминовые димеры блокируют синтез ДНК *in vitro* и *in vivo*, некоторые штаммы *E. coli* оказываются устойчивыми к УФ-облучению и способны восстановить прерванный синтез ДНК даже в темноте. Такое восстановление в этих клетках не свидетельствует о разделении тиминовых димеров; вместо этого димеры с помощью какого-то механизма удаляются из ДНК (кислотонерастворимой фракции) и появляются в кислоторастворимой фракции. В облученном чувствительном штамме, который неспособен синтезировать ДНК в темноте, димеры остаются в нерастворимой фазе и сохраняют способность к фотовосстановлению (R. Setlow and W. Carrier, 1964). Данные другой работы позволяют предполагать, что внутринитевые тиминовые димеры удаляются из ДНК устойчивых клеток ферментативно и что правильная ДНК реконструируется согласно информации, содержащейся в комплементарной нити (P. Boyce and P. Howard-Flanders, 1964). Такой механизм, исправляющий ошибки, должен иметь биологическое значение для сохранения ДНК. Наконец, следует указать, что хотя димеризация 5-бром урацила и затруднена (если вообще возможна), однако при УФ-облучении могут образоваться димеры урацила. Следовательно, ожидается, что УФ мутагенен по отношению к РНК благодаря тем же механизмам, что и для ДНК.

Таутомерные изменения, физические и химические мутагены и низкие pH могут приводить в конечном счете к замене основания. Замещение одного пурина другим ($A \leftrightarrow G$) или одного пиримидина другим пиримидином ($T \leftrightarrow C$) получило название *транзиции* (transition); замещение пурина пиримидином или наоборот (например, $A \leftrightarrow C$ или $T \leftrightarrow G$) по терминологии И. Фриза называют *трансверсией* (transversion). Оба рода замен должны быть возможными на нуклеотидном и субнуклеотидном уровнях.

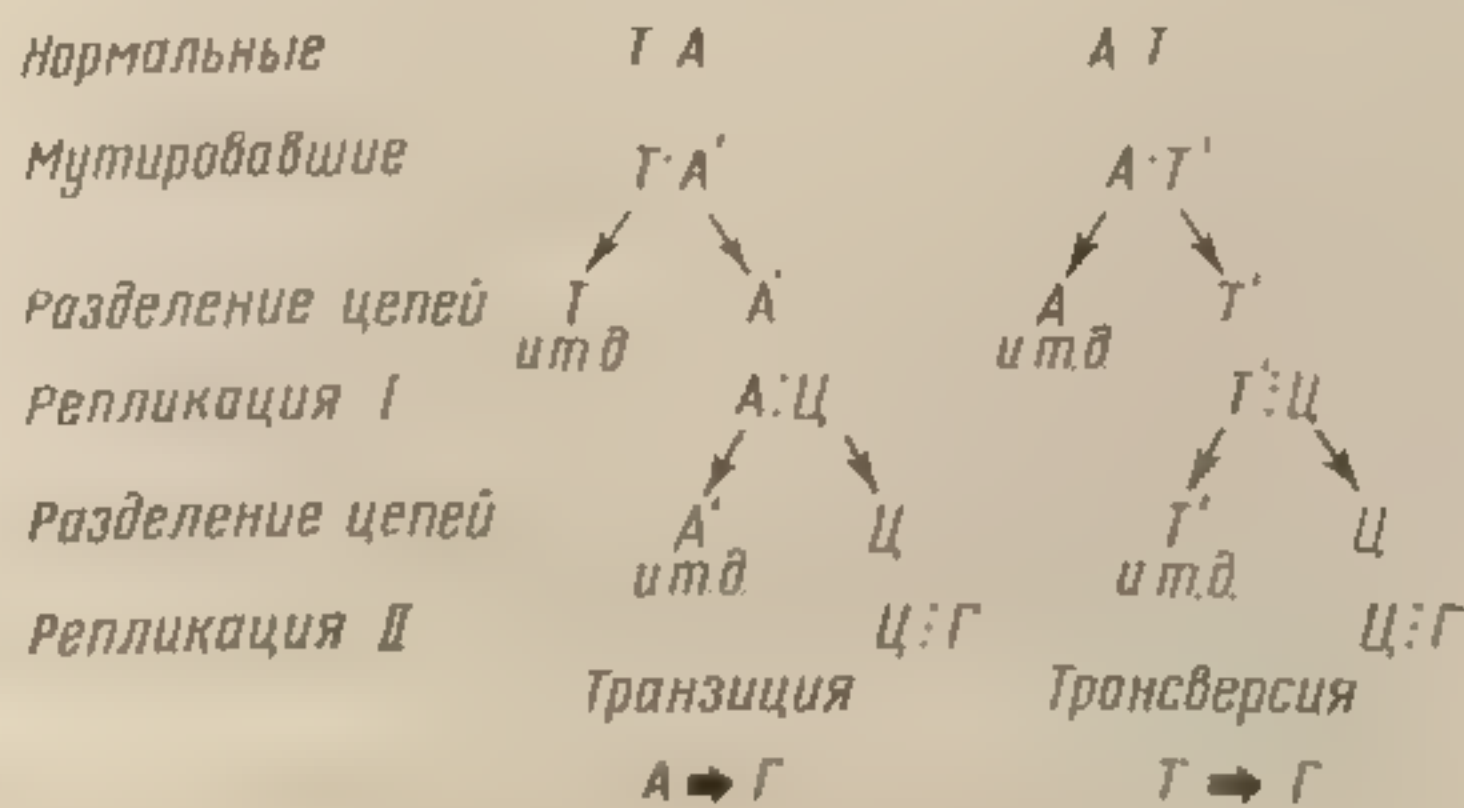
Какова последовательность событий, происходящих при транзиции и трансверсии? Отдельная пара оснований $T : A$ после обработки мутагеном может стать $T : A'$ (рис. 31-5). Допустим, что во время отделения нити A' определяет C (вместо T), а в следующем делении C действует нормально, определяя G .

В результате получается, что исходная нить, несущая A , по существу определяет во второй генерации образование нити, несущей G ; в этом случае происходит транзиция. (В другом случае определенная исходная пара $G : C$ в результате обработки мутагеном образует C' , который определяет A вместо G , а A в свою очередь определяет T . В этом случае происходит также транзиция C на T .)

Если $A : T$ заменяется на $A : T'$, T' определяет C и C определяет G , то в целом результат сводится к замене T на G , т. е. происходит трансверсия.

РИС. 31-5.

Предполагаемая последовательность событий, ведущих к транзиции или трансверсии



Возможен и другой механизм субнуклеотидной замены оснований, при котором члены пары оснований подвергаются *ротационной замене* в результате разрыва их связей с углеводом, поворота на 180° и воссоединения (H. Muller и др., 1961). Так, после ротационной замены, которая часто происходит вследствие действия нонов, Ц:Г превращается в Г:Ц, причем происходящая в результате двойная сложная замена приводит к появлению мутанта. Заметим, что в случае любого из упомянутых механизмов, приводящих к изменению оснований, транзиции и трансверсии определяются изменением в старом основании.

Изменения оснований в новых генах. Аналогичные основания включаются *in vitro* в ДНК, если они присутствуют в виде дезоксирибозид-5'-трифосфатов (стр. 297, 298). Например, урацилом (У), 5-бромурацилом (БУ) или 5-фторурацилом (ФУ) может быть замещен только Т; 5-метил-, 5-бром- или 5-фторцитозин может быть замещен только Ц; гипоксантином можно заместить только Г. БУ, 5-хлорурацил и 5-йодурацил могут замещать некоторые Т в ДНК бактерий, фагов и клетках культуры ткани человека и оказываются также весьма активными мутагенами. 5-бромдезоксипуридин (БУДР) представляет собой более эффективный мутаген, чем БУ, вероятно, потому, что он значительно легче превращается в трифосфат и в меньшей степени препятствует образованию У или Ц.

Рассмотрим типы ошибок, которые могут встречаться при включении БУ. Так как обычный таутомер БУ (подобно Т) находится в кето-форме, этот таутомер включается обычно в пару с А. Однако редкий спольный таутомер БУ (подобно Т), может спариваться с Г, образуя БУ:Г. Поэтому возможны два рода *ошибочного включения* БУ: образование А:БУ и Г:БУ пар. Будучи частью нити ДНК, БУ пары А:БУ может продолжать определять А, так что ошибки при репликации не произойдет. Однако, если БУ переходит в редкую спольную форму и связывается в пару с Г, то исходный А будет замещен Г по типу транзиции, происходящей в результате *ошибки при репликации*. Так как БУ в паре Г:БУ обычно находится в кето-форме, то во время следующей репликации он обычно связывается в пару с А, приводя к замене Г на А. Следовательно, можно ожидать, что пиримидин БУ вызовет замены пуринов в обоих направлениях (А→Г).

Ошибки, происходящие при включении БУ, могут быть изучены *in vitro*. Можно синтезировать кополимер из А и БУ, *dABU* и использовать его в качестве затравки-матрицы в экстенсивном (от 30 до 100%) синтезе при содержании в субстрате ТФФФ, *dAФФФ* и *dГФФФ*.

В таких условиях включение Г происходит с частотой один остаток Г на 2000—2500 остатков А и Т. (С другой стороны, *dAT* не включает Г.) Используя *ГФ*ФФ*, *dAФФФ* и *dБУФФФ* в качестве субстрата для *dABU* затравки-матрицы, осуществляют экстенсивный синтез, и полученный продукт подвергают анализу «ближайшего соседствования» для определения динуклеотидных последовательностей БУГ, ГГ и АГ. Затравка-матрица предположительно содержит строго чередующиеся БУ и А. Следовательно, если в продукте появляется Г, то ожидается, что он будет присоединяться к БУ, в результате чего образуется динуклеотидная последовательность БУГ. Найдены, однако, все три последовательности для Г остатка. Г включается по соседству с БУ или Г (динуклеотидные последовательности БУГ и ГГ) примерно с одинаковой частотой и реже по соседству с А (последовательность АГ). Так как найдены другие последовательности, кроме БУГ, то эти результаты невозможно объяснить только ошибками репликации, вызываемыми БУ затравки-матрицы. Следует также указать, что поведение БУ в *dABU in vitro* может оказаться идентичным или не идентичным поведению БУ, присутствующего в нативной ДНК *in vivo*.

2-Аминопурин индуцирует точечные мутации. В своей нормальной таутомерной форме он может спариваться с Т (двумя Н-связями) или с Ц

(одной Ц-
связывати
в конечно
Много
цифически
(H. Freese
получении
вызывает
что ожида
при изуче
ми мутаге
ции или

МУТАЦИЯ

Завершен
тидов лег
в какой то
лению мут
как в слу
постоянно
положение
щих репли
тате новог
Новый про
от А в одн
мощью пят

- 1) А' мо
- 2) А' м
- 3) А' мо
- 4) А' мо
- 5) А' мо

Следоват
или комбин
или физичес
рекомбинац
определение
(«новое каче
риале»). Кор
ний, иденти
быть определ
по-видимому
мощью котор
ные compone
материала, сл
это самая ма
ла. Поскольку
дает начало м
меньше реком
о субнуклеот
в пределах н
Слово «но
некоторого до

(одной Ц-связью). Находясь в редкой таутомерной форме, он может также связываться с Ц (двумя Н-связями). Вследствие этого могут возникать в конечном счете пиримидиновые транзиции ($T \leftrightarrow C$).

Многочисленные исследования были выполнены, чтобы определить специфические изменения оснований, встречающиеся при точечных мутациях (E. Freese, 1963; E. Freese and E. Freese, 1964). Одна из методик основана на получении мутации с помощью мутагена, действие которого, как ожидается, вызывает специфичные транзиции или трансверсии. Доказательством того, что ожидаемое изменение произошло, может быть получено впоследствии при изучении частоты обратного мутирования, индуцируемого химическими мутагенами, способными и неспособными вызывать обратные транзиции или трансверсии.

МУТАЦИЯ

Завершенные простые или сложные замены или изменения целых нуклеотидов легко идентифицировать как мутации. Однако как определить, в какой точке в серии изменений произошло изменение, приведшее к появлению мутации? Предполагается, что мутация может возникнуть, когда, как в случае одного из обсуждавшихся ранее механизмов, происходит постоянное изменение A на A' . Возражением здесь может служить предположение о том, что A' может более не воспроизводиться при последующих репликациях; однако, если полагать, что мутация возникает в результате нового изменения, то репликации или передачи ее не требуется. Новый продукт A' должен только более или менее постоянно отличаться от A в одном или нескольких из пяти отношений (как определено с помощью пяти различных экспериментальных процедур):

- 1) A' может иметь отличающийся химический состав;
- 2) A' может иметь другую скорость перехода в новую химическую или физическую форму;
- 3) A' может не определять T вообще или определять его не в такой мере, как это делал A ;
- 4) A' может изменить фенотипический эффект цистрона, в котором он локализован;
- 5) A' может влиять на частоту рекомбинации как своей, так и другой рекомбинационной единицы.

Следовательно, правильнее определить мутацию как любое единичное или комбинированное новое идентифицируемое изменение в химических или физических, мутационных или репликативных, функциональных или рекомбинационных свойствах одного или нескольких нуклеотидов. Такое определение мутации включает все аспекты предыдущего определения («новое качественное или количественное изменение в генетическом материале»). Конечно, в настоящее время часть перечисленных выше изменений, идентифицирующих мутацию, по техническим причинам не может быть определена в специфических отдельных нуклеотидах. Тем не менее, по-видимому, важно указать возможные экспериментальные пути, с помощью которых может быть идентифицирована мутация. Субнуклеотидные компоненты не следует считать мельчайшими единицами генетического материала, способными мутировать, лишь исходя из того, что нуклеотид — это самая малая значимая химическая единица генетического материала. Поскольку самая малая часть генетического материала, чье изменение дает начало мутации, по-видимому, меньше нуклеотида (и, следовательно, меньше рекомбинационной единицы), то, вероятно, имеет смысл говорить о субнуклеотидных частях, обеспечивающих ряд мутационных сайтов в пределах нуклеотида.

Слово «новый», используемое в нашем определении мутации, требует некоторого дополнительного пояснения. Было бы совершенно правильным

рассматривать первый случай расщепления как мутацию, так как это определенно новое (никогда прежде не определявшееся) изменение в генетическом материале. Однако после того как было найдено, что расщепление не представляет собой нового свойства, а скорее оказывается правилом поведения спаренных ядерных генов, расщепление стали считать способом генетической рекомбинации, а не мутации. Подобным же образом генетическая трансформация сначала рассматривалась как мутационное событие и только после дальнейших исследований более вероятным оказался механизм генетической рекомбинации.

Рассмотрим данные, обсуждавшиеся в разделе «Активатор и диссоциация», в котором поломки называли мутациями. Поскольку обнаруживается все больше генов диссоциирующего типа, можно ли продолжать считать, что поломки, вызываемые ими, относятся к мутациям? В будущем мы, возможно, придем к заключению, что такие гены обеспечивают другой механизм генетической рекомбинации, по крайней мере у некоторых организмов. Наконец, напомним, что случаи интеграции и деинтеграции F относились к генетической рекомбинации, а не к мутации. Такая интерпретация дана в свете еще не опубликованных данных, показывающих, что существует и другой тип эпизом. В этом случае терминологический переход от мутации к рекомбинации намеренно был укорочен.

Поскольку любое генетическое изменение, первоначально определяемое как новое, может оказаться при дальнейшем изучении не новым, мы всегда можем оказаться вынужденными отнести мутации к генетическим рекомбинациям. Поэтому вполне вероятно, что сегодняшние мутации представляют собой завтрашний новый механизм генетической рекомбинации.

Одним из типов мутационного изменения, которое, по-видимому, менее всего подвержено риску перехода в класс рекомбинации, следует считать субнуклеотидное изменение. Совершенно очевидно, что замещение тимина 5-бромурацилом представляет собой мутацию, однако даже на таком уровне вероятность будущей переклассификации не исключена.

Ротационная замена (A : T становится T : A), которую в настоящее время считают одним из возможных механизмов мутации, может оказаться у некоторых организмов нормальным механизмом генетической рекомбинации.

Поэтому следует, вероятно, ограничить применение термина «мутация» описанием нуклеотидных изменений, которые оказываются скорее естественными, чем новыми. По этой причине мы уже воздержались от того, чтобы назвать мутациями определенные генетические изменения, представляющие собой нормальные этапы жизненного цикла (полиплоидия в клетках печени, хромосомная фрагментация у *Ascaris*), хотя такие изменения считаются мутациями, если они ненормальны или индуцированы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Частота возникновения спонтанных мутаций в значительной мере определяется образующимися внутриклеточно мутагенами и антимутагенами. По этой причине спонтанные мутации во многих отношениях представляют собой случайное событие в нормальном метаболизме клетки, в котором специфически участвуют нуклеиновые кислоты.

Мутационные «горячие участки», определяемые на нуклеотидном уровне, различны для мутантов, встречающихся спонтанно, и для мутантов, индуцированных теми или иными химическими мутагенами.

Согласно рабочему определению мутация — это любое поддающееся обнаружению неприродное изменение, влияющее на химический или физический состав, мутабельность или репликацию, фенотипическую функцию или рекомбинацию одного или нескольких нуклеотидов. Один или несколько целых нуклеотидов могут быть добавлены, утрачены, замещены, повер-

нуты или перенесены в новое положение с инверсией или без нее. Обсуждаются химические и физические мутагены, способные вызывать образование таких мутаций.

Компоненты нуклеотида служат в качестве сайтов для мутации. Описаны мутации, включающие фосфатную часть нуклеотида; предполагается существование мутаций, затрагивающих углеводную часть молекулы нуклеотида. Изменения оснований в старых генах могут происходить несколькими способами, включая таутомерные замещения и димеризацию. Изменение оснований в новых генах могут возникать, например, после обработки химическими аналогами в результате ошибок при включении и репликации. В конечном счете изменения оснований могут привести к делециям, транзициям или трансверсиям.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

31.1. Обсудите причины, влияющие на частоту «спонтанного» мутирования.

31.2. Имеются ли в этой главе какие-либо новые доказательства того, что генотип регулирует свою собственную мутабельность? Объясните.

31.3. Имеется ли в этой главе какая-либо информация относительно генетической или химической природы мутаций?

31.4. Можно ли ожидать, что мутационные «горячие участки» в области rII будут различными при обработке фага T4 5-бромурацилом или при обработке его азотистой кислотой? Почему?

31.5. В 1959 г. И. Тессман показал, что после обработки фага T2 азотистой кислотой образуются крапчатые бляшки, тогда как при такой же обработке фага X174 образуются только нормальные (некрапчатые) бляшки. Какие предположения о структуре ДНК и молекулярных основах мутации позволяют выдвинуть эти результаты?

31.6. С. Заменгоф и С. Грир показали для *E. coli* мутагенность нагревания до 60° С. Какими молекулярными процессами можете Вы объяснить эти результаты?

31.7. Химические вещества, несущие одну, две или несколько реактивных алкилирующих групп (C_nH_{2n+1}), называют соответственно моно-, би- или полифункциональными алкилирующими агентами; многие из них мутагенны. В зависимости от характера той или иной алкилирующей группы ДНК может быть изменена в фосфатной части или в ее основаниях. При каких условиях следует ожидать, что использование алкилирующих агентов в качестве мутагенов окажется неадекватным для изучения молекулярных основ мутаций?

31.8. Насколько постоянным должно быть изменение в нуклеотиде, чтобы его можно было считать мутационным?

31.9. Считаете ли Вы замену Р на Р³² в фосфате нуклеотида мутацией? Почему?

31.10. Считаете ли Вы правильным утверждение, что единственным путем обнаружения изменений в отдельных генах является обнаружение фенотипических изменений?

31.11. *E. coli* содержит локус, способный сообщать устойчивость к фагу T1, подвергнутому воздействию ультрафиолетовых лучей. Однако замещение тимидина на 5-бромдезоксимуридин в фаге приводит к снятию такого рода защиты. Что Вы считаете продуктом бактериального локуса и каков механизм его действия?

ЛИТЕРАТУРА

- S. Benzer and E. Freese. Induction of Specific Mutations with 5-Bromo-uracil.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1958, 44, 112. Reprinted in «Papers on Bacterial Viruses», G. Stent (Ed.). Boston, 1960, p. 220.
- R. P. Boyce and P. Howard-Flanders. Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in *E. coli* K-12.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 293.
- R. A. Deering. Ultraviolet Radiation and Nucleic Acid.—Scient. Amer., 1962, N 207, 135.
- E. Freese. The Difference Between Spontaneous and Base-Analogue Induced Mutations of Phage T4.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1959, 45, 622.
- E. Freese. Molecular Mechanism of Mutations.—In: «Molecular Genetics», J. N. Taylor (Ed.). N. Y., 1963, p. 207. (Э. Фриз. Молекулярный механизм мутаций.—Сб. «Молекулярная генетика». М., изд-во «Мир», 1934).
- E. B. Freese and E. Freese. Two Separable Effects of Hydroxylamine of Transforming DNA.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1289.
- H. Harrington. Effect of X Irradiation on the Priming Activity of DNA.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 59.
- I. H. Herskowitz. The Production of Mutations in *Drosophila melanogaster* with Substances Administered in Sperm Baths and Vaginal Douches.—Genetics, 1955, 40, 76.
- D. R. Krieg. Specificity of Chemical Mutagenesis.—Progr. Nucleic Acid. Res., 1963, 2, p. 125.
- H. E. Kubitschek. Mutation Without Segregation.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1374.
- L. S. Lerman. The Structure of the DNA — Acridine Complex.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 1963, 49, 94.
- A. D. McLaren and D. Shugar. Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids.—N. Y., 1964.
- C. G. Mead. The Enzymatic Condensation of Oligodeoxyribonucleotides with Polydeoxyribonucleotides.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1482.
- H. J. Muller, E. Carlson and A. Schalet. Mutation by the Alteration of the Already Existing Gene.—Genetics, 1961, 46, 213.
- A. Novick. Mutagens and Antimutagens.—Brookhaven Symposia on Biology, 1956, 8, 201. Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 74.
- A. Novick and L. Szilard. Experiments on Spontaneous and Chemically Induced Mutations of Bacteria Growing in the Chemostat.—Cold Spring Harb. Sympos. Quant. Biol., 1951, 16, p. 337.—Reprinted in «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 47.
- R. B. Setlow, W. L. Carrier. The Disappearance of Thymine Dimers from DNA: An Error-Correcting Mechanism.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 226.
- Symposium on Molecular Action of Mutagenic and Carcinogenic Agents.—J. Cell. Comp. Physiol., 1964, 64 (Suppl. 1), 1964, p. 191.
- B. E. Tergazhi, G. Streisinger and F. W. Stahl. The Mechanism of 5-Bromo-uracil Mutagenesis in the Bacteriophage T4.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1519.
- T. A. Trautner, M. N. Swartz and A. Kornberg. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid, X. Influence of Brom-uracil Substitutions on Replication.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 449.
- A. Wacker. Molecular Mechanisms of Radiation Effects.—Progr. Nucleic Acid Res., 1963, 1, p. 369.

В перпо
мальном
являются
нормаль
для клет
являющ
зультат
самые ра
ческая ре
в свою оч
зуется по
дующие
геном нач
ния, в кл
разных х
являющих
поэтому,
ко многим
мутаций (и
действие (и
эффектов,
ления — э
мых эффек
эффектов с
отождеств
веществ, ка
Приняв
к рассмотре
генетики. С
можно полу
рый может
легко опред
нения, обус

АЛКАНТОНУ

У человека
ние, которое
выделения, с
вращается в
няется в тече
Исследова
мальные роди
ные дети появ
когда родителей
шения. На
в семьях и д

ДЕЙСТВИЕ ГЕНА И ПОЛИПЕПТИДЫ

В период интерфазы ядро играет весьма активную и важную роль в нормальном метаболизме клетки. Если допустить, что хромосомные гены являются единственными ядерными компонентами, существенными для нормального метаболизма, а все особенности метаболизма, характерного для клеток, определяются действием генов, то все проявления фенотипа, являющиеся генетическими по природе, следует рассматривать как результат биохимической деятельности генов. Поскольку клетка содержит самые разнообразные химические вещества, можно ожидать, что биохимическая реакция, определяемая одним геном, приведет к другим, которые в свою очередь, будут стимулировать новые реакции. В результате образуется подобие дерева, разветвления которого представляют собой следующие одну за другой химические реакции. Так как определяемое геном начальное биохимическое изменение будет влиять на все ответвления, в клетке или особи, завершившей развитие, мы сможем найти много разных химических, физиологических и морфологических изменений, являющихся следствием первоначального изменения. Неудивительно поэтому, что одно определенное генетическое изменение обычно ведет ко многим различным фенотипическим изменениям и что большинство мутаций (или даже все мутации) имеют множественное, или плеiotропное, действие (глава 6). Если проследить происхождение таких плеiotропных эффектов, можно обнаружить, что многие разнообразные конечные проявления — это следствие значительно меньшего количества ранее проявляемых эффектов. Кроме того, можно ожидать, что первичная основа таких эффектов связана с метаболическими изменениями. Эти изменения иногда отождествляют с модификациями таких специфических химических веществ, как гемоглобин или гормон гипофиза (глава 6).

Приняв во внимание все вышесказанное, мы можем перейти теперь к рассмотрению биохимической основы действия гена — *биохимической генетики*. Сведения относительно биохимической основы действия гена можно получить при изучении такого признака, как пигментация, который может быть выражен химически и в силу этого позволяет сравнительно легко определить точно или почти точно первичные биохимические изменения, обуславливаемые генами.

АЛКАНТУРИЯ

У человека изредка встречается обнаруживаемое при рождении состояние, которое влияет на цвет мочи. Будучи нормальной по цвету после выделения, она скоро темнеет при контакте с воздухом и из светлой превращается в темно-коричневую и затем черную. Это свойство мочи сохраняется в течение всей жизни человека.

Исследования семейств, родословных и популяций показали, что нормальные родители могут иметь больных детей любого пола, причем больные дети появляются со значительно большей вероятностью в тех случаях, когда родители, будучи оба нормальными, находятся в родственных отношениях. На основании определения частоты встречаемости больных в семьях и данных о том, что потемнение мочи может быть выражено

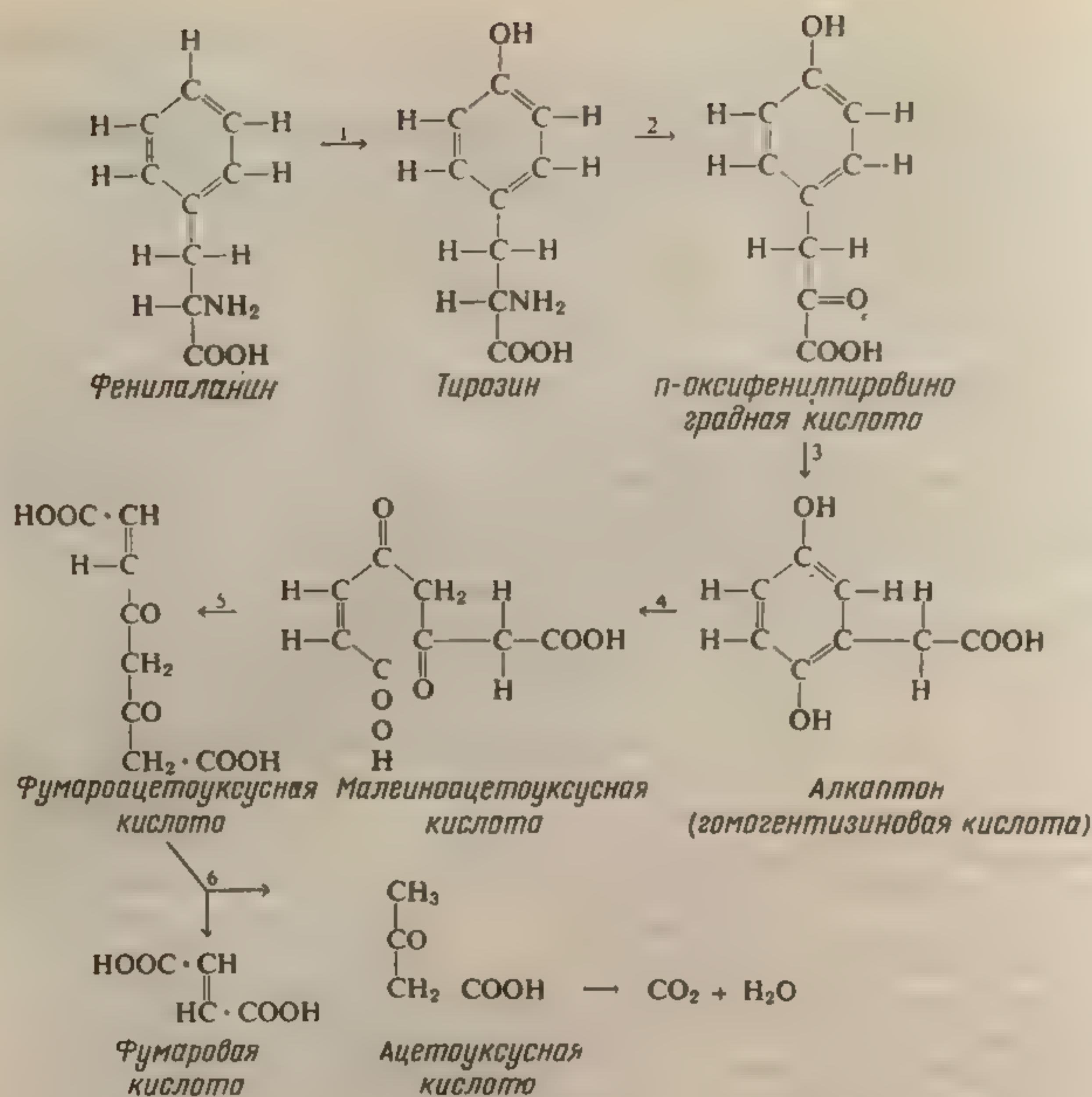


РИС. 32-1.

Ряд химических веществ, участвующих в образовании и метаболизме алкаптона.

4-оксидаза гомогентиизиновой кислоты, 5-изомеразы, 6-гидролазы. Процесс 3 включает две реакции: окисление до 2,5-диоксифенилпировиноградной кислоты и затем окислительное декарбоксилирование.

полностью или не выражено совсем, можно заключить, что больные индивидуумы являются гомозиготами в отношении одной пары полностью рецессивных аутосомных генов.

Потемнение мочи обусловлено окислением содержащегося в ней определенного вещества, названного алкаптоном, или гомогентиизиновой кислотой, а по химическому составу представляющего собой 2,5-дигидрофенилуксусную кислоту (рис. 32—1). Эта болезнь получила название алкаптонурии¹. Следует также указать, что были обнаружены отдельные линии, у которых, по-видимому, тот же фенотип определяется действием одного доминантного гена. Поскольку биохимические исследования доминантной алкаптонурии не были достаточно широкими, мы ограничим наше внимание лишь рецессивной формой этой болезни.

Алкаптонурия обусловлена несомненно врожденной ошибкой метаболизма и ведет к ежедневному выделению нескольких граммов алкаптона. Биохимическое исследование больных алкаптонурией показывает, что из многочисленных проверенных веществ в ненормальных количествах в моче или крови появляется только алкаптон; восстанавливающие свойства

Последующее изложение основано на работе А. Е. Гаррода и других исследователей

ва мочи могут быть полностью приписаны алкаптону, который она содержит. Отсюда возникает возможность установить прямую связь между рядом эффектов и первичным эффектом гена или приблизиться к решению этого вопроса.

Если алкаптон представляет собой вещество, образуемое мутантным геном, то он должен отсутствовать у гомозигот по нормальному аллелю. В случаях, когда больные алкаптонурией получают пять граммов алкаптона, примерно такое же дополнительное количество его они выделяют с мочой. Нормальные индивидуумы, получившие то же количество алкаптона, не выделяют его с мочой. В тех же случаях, когда нормальные индивидуумы получают восемь граммов алкаптона, какую-то часть его удается обнаружить в моче. Эти наблюдения позволяют заключить, что нормальные индивидуумы способны превращать алкаптон в другую форму, которая не изменяет цвета при воздействии воздуха: такая способность, по-видимому, полностью утрачена больными алкаптонурией. Следовательно, ненормальная деятельность гена выражается не в образовании алкаптона как некоего уникального вещества. Алкаптон представляет собой, по-видимому, нормальный продукт метаболизма, который не накапливается у нормальных индивидуумов, так как он быстро обменивается, но накапливается у больных алкаптонурией. Показано, что в крови больных алкаптонурией отсутствует фермент, присутствующий в крови нормальных лиц, который катализирует превращение алкаптона путем окисления в вещество, не дающее окрашивания. Этот фермент, *оксидаза гомогентизинозой кислоты*, отсутствует в печени больных алкаптонурией; по-видимому, у больных этот фермент изменен.

Таким образом, алкаптон не является особым продуктом гена, определяющего алкаптонурию, а представляет собой нормальный промежуточный продукт метаболизма. Поскольку это вещество не является обычным продуктом питания, оно должно иметь химических предшественников. Если такой предшественник алкаптона добавлен в диету больного алкаптонурией, то он превращается в алкаптон, который, в свою очередь, выделяется в увеличенных количествах. В случаях, когда больные алкаптонурией съедают избыточное количество глюкозы, количество алкаптона, найденного в моче, остается неизменным, что свидетельствует о том, что глюкоза не является предшественником алкаптона. Однако в тех случаях, когда содержание либо *p*-оксибензилпропионовидной кислоты, либо одной из двух аминокислот (тирозина или фенилаланина) увеличены в диете больного алкаптонурией, выделение ими алкаптона возрастает почти столь же, как и содержание предшественника. Следовательно, можно утверждать, что алкаптон имеет ряд химических предшественников (рис. 32—1). В представленной схеме фенилаланин превращается в тирозин путем присоединения кислорода к верхнему (на схеме) углероду; тирозин превращается в *p*-оксибензилпропионовидную кислоту путем замещения аминогруппы кислородом; *p*-оксибензилпропионовидная кислота превращается с помощью других химических реакций в алкаптон. В норме алкаптон превращается в ацетоксусную кислоту с помощью процесса, включающего окисление и раскрытие бензольного кольца; это — первая ступень в таком превращении, которую неспособны осуществлять больные алкаптонурией. Такой предполагаемый путь от фенилаланина через алкаптон к ацетоксусной кислоте был подтвержден последующими исследованиями, в которых было идентифицировано семь катализируемых ферментами этапов превращения.

Следует указать, однако, что тирозин, являющийся существенным компонентом белка, может принимать участие в биохимических процессах, ведущих не только к образованию алкаптона (рис. 32—1). Например, тирозин принимает участие в химических реакциях, ведущих к образованию меланина; следовательно, тирозин в другом химическом процессе

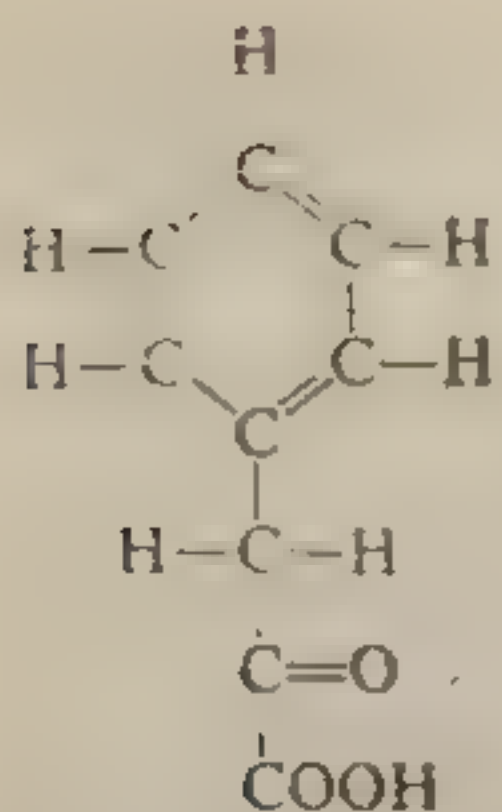


РИС. 32-2.

Формула фенилпировиноградной кислоты

является предшественником меланина. Альбинизм (недостаток или отсутствие меланина) может быть обусловлен генетически как результат дефектного образования фермента, необходимого для превращения тирозина в меланин.

В случае другой болезни, обусловленной одним редко встречающимся рецессивным геном, больные индивидуумы страдают слабоумием или их умственное развитие несколько ниже нормального. Кроме того, у них отмечаются и другие фенотипические изменения, включая слабую пигментацию. Такой плеiotропизм непосредственно коррелирует с присутствием фенилпировиноградной кислоты в моче больных. У таких лиц не происходит нормального превращения фенилаланина в тирозин; вместо этого аминогруппа фенилаланина замещается кислородом (образуется кетогруппа), в результате чего образуется фенилпировиноградная кислота (рис. 32-2). Эта болезнь получила название *фенилкетонурия* (глава 15). Состояние больных фенилкетонурией может быть частично облегчено, если количество фенилаланина, являющегося существенным компонентом белков, уменьшено в диете до количества, достаточного для белкового синтеза и недостаточного для того, чтобы какие-то ощутимые количества его превратились в фенилпировиноградную кислоту. Тирозин необходим для синтеза белка у человека; поэтому он должен присутствовать в диете больного фенилкетонурией в достаточном количестве. Наконец, следует указать, что *парагидроксилаза*, которая превращает фенилаланин в тирозин и нормально присутствует в печени (где большая часть фенилаланина обычно обменивается и окисляется), не была обнаружена у больных фенилкетонурией.

Врожденные дефекты метаболизма оказывают большую помощь при идентификации случаев, когда гены управляют метаболическими процессами. Они позволяют также определить предшественников генетически дефектных этапов и помогают при изучении цепей биохимических реакций и метаболических путей. Например, если мутант 1 неспособен образовывать вещество Y, но накапливает вещество X и если мутант 2 может образовать только Y при добавлении вещества X, тогда вещество X должно быть предшественником Y (рис. 32-3).

Биохимическая генетика представляет особый интерес и в другом отношении. В случаях, исследованных наиболее тщательно, удается проследить путь от ряда эффектов обратно к той точке, где только один эффект определяется геном, как в случае алкаптонурии. Совершенно невероятно, что дальнейшее изучение гена, определяющего алкаптонурию, позволит обнаружить другой фенотипический эффект, который, будучи соответственно изучен, покажет, что он возникает независимо от изменения оксидазы гомогенизированной кислоты. Следовательно, представленные данные можно рассматривать как одно из доказательств того, что этот ген оказывает влияние на фенотип только одним первичным способом.

РИС. 32-3.

Определение предшественников с помощью мутантных генов

A — накапливает вещество X, но не образует вещество Y; B — не образует вещества X, но при добавлении вещества X способен образовывать вещество Y; B — нормальный процесс биосинтеза

ГИПОТЕЗА
ОДНА ПЕР

Данные в главе 6, каждый ген все плеiotропизм. Если бы была доказана генетическая первичная функциональная роль такого рода эффект и того, гипотеза дополнительная то известности установить тами дейст

Случай, вичный эффект ферментов ферментов возможным способностью Экспериментально должно так тверждение пический э

ГИПОТЕЗА «С

Neurospora п чения генети этот организм *Neurospora* способ продукции Эта среда мо источники азот ственных эле и единственн ровать 20 ра биотина), пу ртельности. С ваны мутации ферментов, в синтезы.

Последняя ставляет собой ным производ фермента опре но получить м В₁-образующе активного В₁- сколько В₁ не и будет нужда

ГИПОТЕЗА «ОДИН ГЕН — ОДНА ПЕРВИЧНАЯ ФУНКЦИЯ»

Данные биохимической генетики, представленные в этой главе (а также в главе 6), привели нас к рассмотрению гипотезы, предполагающей, что каждый ген имеет только один первичный фенотипический эффект, причем все плеiotропные проявления гена обусловлены лишь этой активностью. Если бы гипотеза «*один ген — один первичный фенотипический эффект*» была доказана, то это помогло бы определить размер или протяженность генетического материала, деятельность которого обуславливает один первичный эффект. Такие данные способствовали бы выяснению природы функциональной генетической единицы; однако следует указать, что такого рода информация зависит от того, как понимается первичный эффект и что идентифицируется как фенотипический эффект. Кроме того, гипотеза «один ген — один первичный эффект» позволяет сделать дополнительные выводы. Если нам известна природа первичного эффекта, то известно также, что такой первичный эффект — всегда результат деятельности одного гена. Чтобы проверить это предсказание, необходимо установить, какие из проявлений фенотипа являются первичными эффектами действия генов.

Случаи, которые мы только что рассматривали, показывают, что первичный эффект мутантного гена проявляется в каталитической способности фермента. Если допустить, что каталитическая способность всех ферментов определяется первичной деятельностью генов, то окажется возможным изучить любой фермент и показать, что его каталитическая способность может быть изменена или утрачена в результате мутации. Экспериментальное подтверждение гипотезы «*один фермент — один ген*» должно также обеспечить определенное — хотя и ограниченное — подтверждение более общей концепции «один ген — один первичный фенотипический эффект».

ГИПОТЕЗА «ОДИН ФЕРМЕНТ — ОДИН ГЕН»

Neurospora представляет собой очень удобный объект не только для изучения генетической рекомбинации (стр. 133); некоторые ее свойства делают этот организм очень удобным для биохимических исследований. *Neurospora* способна синтезировать все необходимые для существования и репродукции компоненты, используя очень простую питательную среду. Эта среда может состоять из воды, ряда неорганических солей (включая источники азота, фосфора, серы и следовые количества различных существенных элементов), источника углерода и энергии (например, сахара) и единственного витамина, биотина. Из этого сырья она может синтезировать 20 различных аминокислот, все необходимые витамины (кроме биотина), пурины, пиримидины и вообще все необходимое для ее жизнедеятельности. Согласно рассматриваемой гипотезе, могут быть индуцированы мутации, которые приведут к изменению каталитической способности ферментов, в результате чего будут блокированы различные химические синтезы.

Последняя ступень в биосинтезе витамина B_1 (тиамина) в норме представляет собой ферментативное соединение одного из тиазолов с определенным производным пиримидина. Если каталитическая активность каждого фермента определяется первичным действием генов, то, по-видимому, можно получить мутации в гене, определяющем в норме специфичность этого B_1 -образующего фермента. Если мутация ведет к нарушению образования активного B_1 -образующего фермента, то B_1 более не синтезируется. Поскольку B_1 необходим для роста, то мутантный штамм будет ауксотрофом и будет нуждаться в присутствии в среде витамина B_1 .

Для выделения таких B_1 -зависимых мутантов можно провести эксперимент (G. W. Beadle, E. L. Tatum, 1959), в котором гаплоидные споры, образуемые бесполом путем, обрабатывают мутагенами, например, рентгеновыми или ультрафиолетовыми лучами. Обработанные споры выращивают затем на основной среде, содержащей витамин B_1 . Среди проросших в таких условиях спор будут присутствовать как прототрофы в отношении B_1 , так и ауксотрофы, которые получают B_1 из культуральной среды. После того как споры проросли достаточно хорошо, каждый из проростков помещается на минимальную среду, в которую добавлены производные тиазола и пиримидина; последние служат непосредственными предшественниками витамина B_1 . (Все другие ингредиенты, за исключением самого B_1 , могут быть также добавлены, однако они не влияют на результат эксперимента.). Культуры, которые не способны расти на среде, содержащей прямые предшественники B_1 , явно дефектны в отношении фермента, катализирующего последнюю ступень биосинтеза B_1 . Клоны таких культур ведут от колоний, растущих в присутствии B_1 . Для изучения и локализации генетической основы ауксотрофности в отношении B_1 каждый из таких гаплоидных штаммов скрещивается с гаплоидным штаммом, нормальным в отношении синтеза B_1 . В клетках образующегося диплоидного гибрида происходит мейоз (глава 9). В результате образуется аск, содержащий восемь гаплоидных аскоспор. Каждая из восьми аскоспор извлекается и выращивается на минимальной среде с B_1 . Если проверяемый гаплоидный штамм оказывается в самом деле недостаточным по B_1 , то последующая пересадка каждой из восьми гаплоидных культур на минимальную среду без B_1 дает ровно четыре штамма, которые могут расти в такой среде, и ровно четыре, которые в этих условиях не растут. Таким образом удастся выделить недостаточные по B_1 -мутанты, которые не содержат конечной в цепи синтеза этого витамина ферментативной активности, что и следовало ожидать, основываясь на нашей гипотезе.

Если проанализировать таким образом ряд асков определенного мутанта, то можно картировать местоположение мутации относительно центромеры хромосомы, в которой она расположена (см. рис. 9—9). В случаях, когда между локусами мутанта и центромерой не встречается хиазм, расщепление нормальных (+) и мутантных [*th* (thiamine)] аллелей будет встречаться в первом мейотическом делении; поскольку последние два деления в асках следуют друг за другом после первого, то восемь аскоспор должны быть расположены в следующем порядке: + + + + *th th th th*.

Если, однако, между мутантом и центромерой будет иметь место одна хиазма, то расщепление произойдет во втором мейотическом делении и аскоспоры будут расположены в следующем порядке:

+ + *th th* + + *th th*.

Если сделана запись порядка расположения спор в каждом аске, порядок расщеплений при первом или втором делении может быть установлен после того, как будет определен генотип спор. В случаях, когда в 20% асков расщепление произошло во втором делении (две + споры, чередующиеся с двумя *th* спорами), 20% тетрад имели хиазмы между мутацией и центромерой. Следовательно, мутация расположена на расстоянии 10 единиц картирования от центромеры.

Таким способом был локализован ряд независимо полученных точечных мутаций, дефектных в отношении фермента, катализирующего последнюю ступень биосинтеза B_1 . В результате удалось показать, что все они расположены на одной и той же хромосоме и, по-видимому, на одинаковом расстоянии от центромеры. Этот факт дает возможность предполагать, что каталитическая способность определенного фермента является результатом действия одного определенного гена.

В п
Neurosp
модифи
с доба
вести
на осно
неспосо
культур
ментов,
ся поср
случае
Были ра
ных кле
коротко
подверга
ние бол
(нерасту
убивает
тельно н
на налич
Оказалос
факторов
нормальн
и неизвес
требующи
быть исп
выделени
Такие
мутантов
ний для
кратко ещ
ступени в
исходит со
аминокисл
тазой. Бы
торых бло
из 25 изуч
приблизит
Во втор
биосинтеза
фермент от
зультате че
мутаций, п
чительную
на одной х
рующие ра
лимых учас
Эти и п
у Neurosp
лагающей, ч
контролем
товых факто
там, непоср
плесень сов
тверждает,
выражающу
мента. Если

В целях более эффективного выделения биохимических мутантов у *Neurospora* в уже описанный в общих чертах метод введены некоторые модификации. Споры потенциальных мутантов выращивают на среде с добавлением всех веществ, нарушение синтеза которых может привести к биохимической мутации. Выросшие культуры переносятся затем на основную (минимальную) среду. Те из них, которые оказываются неспособными расти на такой среде, регистрируются как мутантные культуры, утратившие способность синтезировать какой-либо из компонентов, добавленных к основной среде. Специфичность мутации определяется посредством проверки роста на основной среде, обогащенной в каждом случае одним из компонентов, входивших в состав полноценной среды. Были разработаны также методики селективного избавления от немутантных клеток. Так, например, спорам давали возможность расти в течение короткого промежутка времени на минимальной среде, после чего их подвергали либо фильтрации, в результате которой происходило разделение больших (прорастающих) немутантных спор и значительно меньших (нерастущих) мутантных спор, либо действию антибиотика, который убивает активно растущие культуры, но не влияет или влияет незначительно на нерастущие споры. В результате образец, проверяемый позднее на наличие в нем мутантных клеток, может быть обогащен последними. Оказалось также возможным выделить мутанты в отношении неизвестных факторов роста путем обогащения культуральной среды экстрактами нормальных штаммов *Neurospora*, содержащими как известные, так и неизвестные вещества, необходимые для роста этой плесени. Мутанты, требующие присутствия каких-то неизвестных факторов роста, могут быть использованы в специфических биохимических исследованиях для выделения и идентификации таких веществ.

Такие усовершенствования в методиках выделения биохимических мутантов у *Neurospora* ускоряют проведение дополнительных исследований для проверки предполагаемой взаимосвязи фермент—ген. Опишем кратко еще два примера. В первом случае имело место изучение конечной ступени в биосинтезе аминокислоты триптофана, в течение которой происходит соединение индола (в виде индолглицеролфосфата) с 3-углеродной аминокислотой серином, катализируемое ферментом *триптофансинте-тазой*. Были выделены независимо возникшие точечные мутанты, у которых блокирована последняя ступень биосинтеза. Было показано, что из 25 изученных мутаций все 25 расположены в одной и той же хромосоме, приблизительно в одном и том же локусе.

Во втором случае изучались мутанты, несущие блок в конечной ступени биосинтеза аденина, катализируемой ферментом *аденилсукциназой*. Этот фермент отщепляет янтарную кислоту от аденил-янтарной кислоты, в результате чего образуется аденин. Из 137 независимо выделенных точечных мутаций, приводящих к полной потере или сохраняющих лишь незначительную активность аденил-сукциназы, все 137 были локализованы на одной хромосоме примерно в одном и том же локусе. Гены, контролирующие различные ферменты, различны и локализуются в разных разделных участках генома.

Эти и подобные этим результаты, полученные для других ферментов у *Neurospora*, служат существенным подтверждением гипотезы, предполагающей, что каталитическая способность всех ферментов находится под контролем генов. Добавление B_1 , триптофана или аденина в качестве ростовых факторов в среду культивирования мутантов, дефектных по ферментовых факторов в среду культивирования мутантов, дефектных по ферментам, непосредственно ответственным за соответствующие синтезы, делает плесень совершенно нормальной или почти нормальной. Этот факт подтверждает, что эти гены способны осуществлять только одну функцию, выражающуюся в определении каталитической способности одного фермента. Если бы ген имел не один первичный эффект, то невозможно было

бы в любом случае восстановить нормальный или почти нормальный рост посредством возмещения одного питательного дефекта. Во всех описанных случаях ферментативная недостаточность обусловлена дефектом только в одном специфически локализованном участке генетической карты; поэтому общая каталитическая способность фермента является, по-видимому, результатом первичной деятельности одного гена.

ГИПОТЕЗА «ОДИН ГЕН — ОДИН ПОЛИПЕПТИД»

Известно, что все ферменты целиком или по крайней мере частично являются белками, а каталитическая активность фермента обусловлена его белковой частью и (часто) добавочными кофакторами. Белки состоят из аминокислот (рис. 32—4), соединенных друг с другом пептидными связями, имеющими место между карбоксильной и аминной группами, в результате чего образуется полипептидная цепь. Каталитическая активность фермента зависит от числа и типа содержащихся аминокислот, их порядка в полипептиде, а также от числа полипептидных цепей, характера расположения частей полипептидной цепи относительно друг друга и характера расположения различных полипептидных цепей белка относительно друг друга.

У бактерии *Escherichia coli* был обнаружен фермент триптофансинтетаза, который можно обработать *in vitro* таким образом, что он диссоциирует на два белка, т. е. на две полипептидные цепи. Как и следовало ожидать, ни одна из этих цепей не имеет обычной ферментативной активности. Однако при вторичном объединении таких цепей нормальная ферментативная активность восстанавливается. Очевидно, для существования специфической ферментативной активности обе цепи должны быть соединены. Способность двух цепей легко разъединяться и снова соединяться свидетельствует о том, что, по-видимому, не существует сложного, контролируемого геном, физического или химического изменения, необходимого для их объединения. Следовательно, основа катализирующей способности фермента должна быть заложена в самой природе полипептидных цепей, которые, соединяясь, образуют определенный фермент — триптофансинтетазу. Такое заключение ведет к предположению, что каждая из цепей может быть результатом первичного действия различных генов.

Оказалось возможным получить ряд бактериальных мутантов, утративших активность триптофансинтетазы (С. Janofsky, L. P. Crawford, 1960). Некоторые из них были дефектны в отношении одной полипептидной цепи, другие — в отношении другой. Генетические исследования показали, что все мутации, обуславливающие дефект в одной цепи, могли быть отделены посредством рекомбинации от мутаций, обуславливающих дефект в другой цепи, хотя при этом затрагивались смежные области генетической карты. В этом случае мы можем рассматривать две смежные области либо как один функциональный ген, либо как два отдельных гена. Поскольку природа этого фермента, по-видимому, зависит от того материала, который каждая из этих двух генетических областей образует в отдельности, можно считать, что существуют два гена и что каждый ген полностью определяет характер полипептидной цепи. Соединение двух цепей, составляющих триптофансинтетазу, может быть каким-то образом связано с тем, что оба эти гена сцеплены.

Какое отношение имеют эти результаты к общей гипотезе «один ген — один первичный фенотипический эффект»? Общая гипотеза остается неизменной; однако частную гипотезу — «один фермент — один ген» — приходится уточнить. Ее следует теперь формулировать так: «один полипептид — один ген», имея в виду, что состав полипептидной цепи полностью определяется одним геном. Тогда, согласно общей гипотезе, первичная функция по крайней мере некоторых генов состоит всецело в определении аминокис-

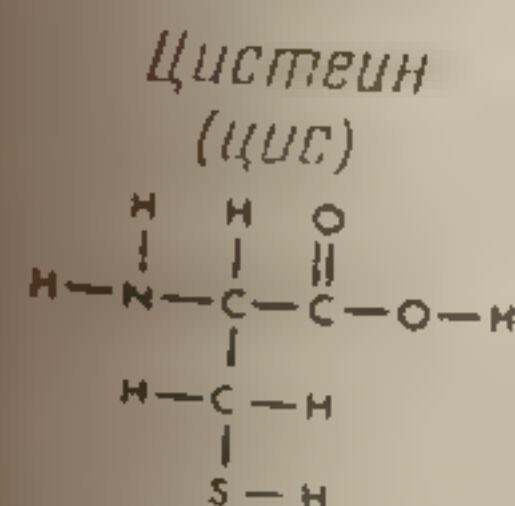
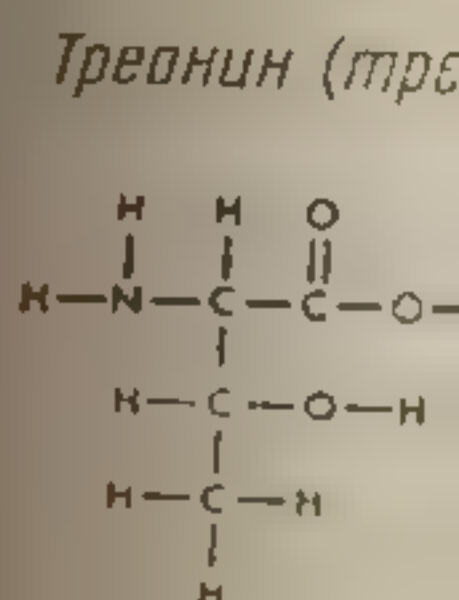
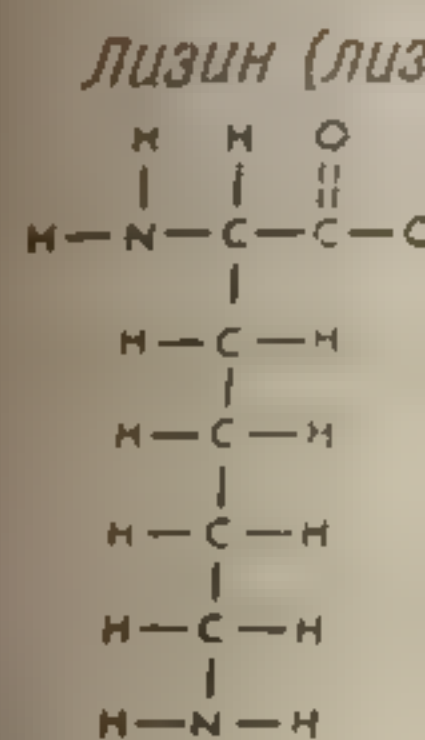
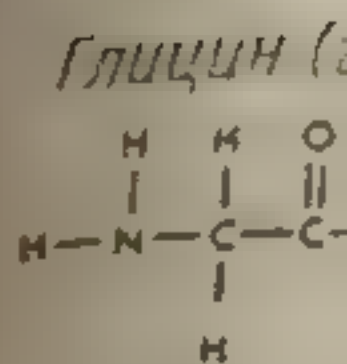


Рис. 32-4.
20 встречающ...

лотного состо...
ген» правил...
в каждом бе...
сти, — всецел...
гена.

БИОХИМИЧЕС

У человека ге...
около 66 700...
имеет форму

1 Изложение осв

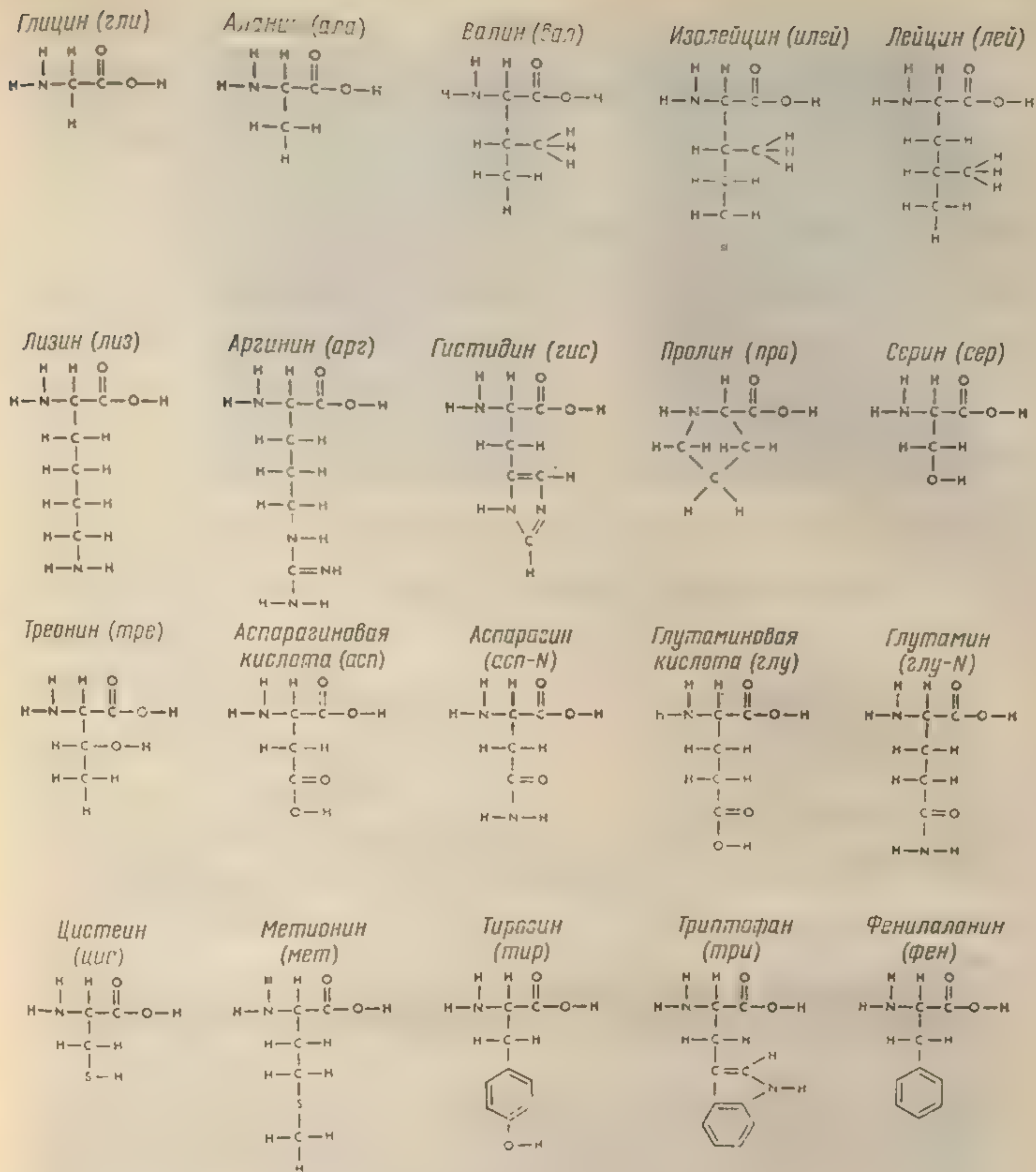


РИС. 32-4.

20 встречающихся обычно аминокислот

лотного состава полипептида. Если гипотеза «один полипептид — один ген» правильна, то следует полагать, что каждая полипептидная цепь в каждом белке — включая белки, лишенные ферментативной активности, — всецело определяется первичным и единичным действием одного гена.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА ГЕМОГЛОБИНА

У человека гемоглобин¹ представляет собой белок с молекулярным весом около 66 700. У лошади (и, вероятно, у человека) молекула гемоглобина имеет форму сфероиды и размеры $55 \times 55 \times 70 \text{ \AA}$. Эта молекула состоит

¹ Изложение основано на работах В. Ингрема, Л. Полинга и др.

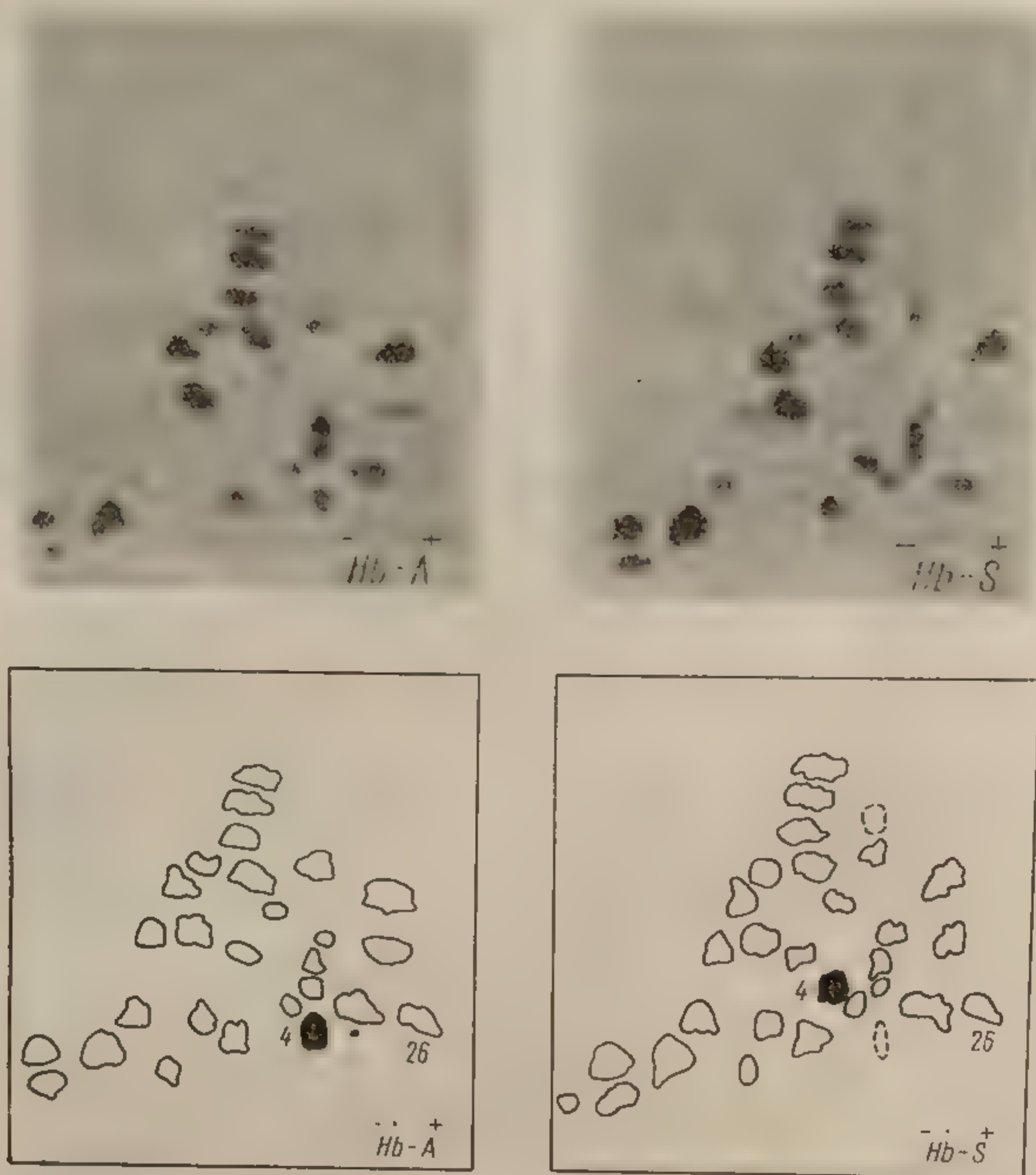


РИС. 32-5.

«Отпечатки пальцев» (пептидные карты) гемоглобина, полученные после его обработки трипсином (Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 392—396)

из двух димеров. Каждый димер содержит две идентичные полипептидные цепи, а полипептиды двух димеров обычно различны. Каждая из четырех мономерных цепей содержит около 140 аминокислот и имеет молекулярный вес около 17 000. Цепи частично свернуты в так называемые правовращающиеся спирали, причем разные цепи свернуты относительно друг друга строго определенным образом. Каждая цепь имеет группу гема, содержащую железо, которая попадает в углубление на внешней стороне спиральной цепи. В целом молекула гемоглобина содержит четыре группы гема (по одной на каждую цепь) и около 560 аминокислот. Впредь мы будем рассматривать данные, связанные лишь с белковой частью этой молекулы, так называемым глобином, так как группы гема не связаны с обнаруженными изменениями.

Гемоглобин нормального взрослого человека содержит три компонента: А (или A_1), A_2 и A_3 . Компонент А, названный *гемоглобином А* ($Hb - A$), составляет примерно 90% от всего гемоглобина, в то время как компонент A_2 ($Hb - A_2$) — около 2,5%. Остаточные примерно 7,5% приходятся на компонент A_3 ; последний представляет собой, по-видимому, $Hb - A$, который изменился химически в результате старения красных кровяных телец.

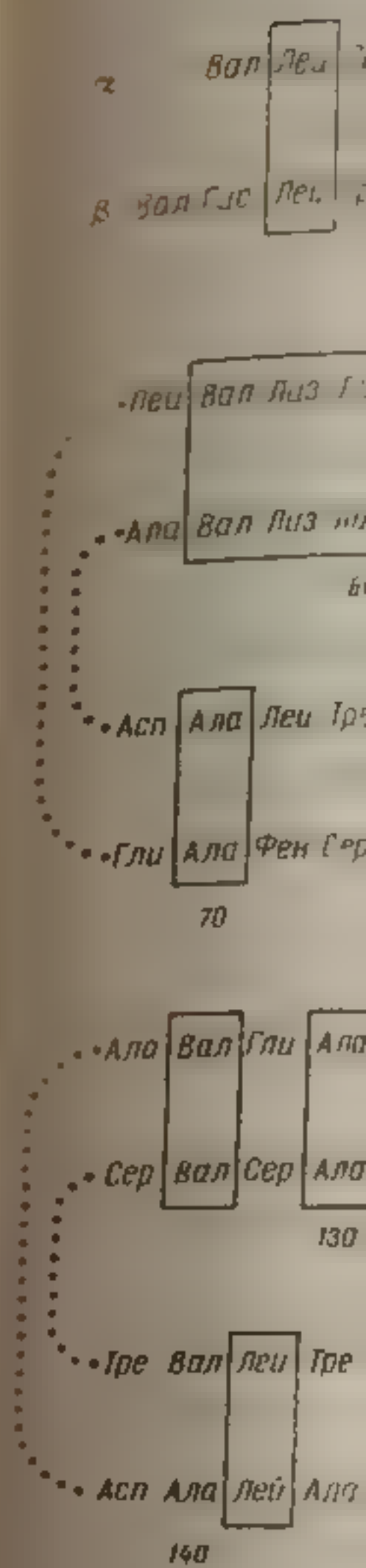


РИС. 32-6.

Последов.

Аминокислотное положение

Гемоглобин — это тетрамер, состоящий из двух α-цепей и двух β-цепей. Каждая цепь имеет группу гема, содержащую железо. В результате окисления железа в гемоглобине происходит изменение его свойств. Для этого используются различные методы, такие как электрофорез и хроматография. При этом важно учитывать, что гемоглобин может существовать в нескольких формах, в зависимости от степени окисления железа и наличия различных модификаций. С помощью этих методов можно определить состав гемоглобина и выявить возможные изменения, связанные с различными заболеваниями.

аминокислот в α^1 и β^4 -цепях (рис. 32—6). Следует отметить, что валин в пептиде 4 находится в N-конце цепи β^4 .

Гетерозиготы по гену *серповидноклеточности* имеют «признак серповидноклеточности», легко определяемый в условиях значительно меньшего, чем нормальное, парциального давления кислорода; гомозиготные носители этой мутации поражены «серповидноклеточной анемией» и их красные кровяные клетки оказываются серповидными даже в тех случаях, когда парциальное давление кислорода уменьшено не так резко. Гемоглобин больных разделили на пептиды и определили их аминокислотный состав. Гомозиготный мутант имеет гемоглобин, идентичный гемоглобину А, с одним исключением: шестая аминокислота в пептиде 4, глутаминовая кислота (выделена курсивом в только что приведенной последовательности), замещена валином (см. также рис. 32—5). Гетерозигота образует оба типа гемоглобина: ненормальный, названный *гемоглобином S* (*Hb — S*), и гемоглобин А. Последующее изучение гена серповидноклеточности (см. главу 6 и стр. 224) показало, что множественные фенотипические проявления, наблюдаемые в потомстве, представляют собой следствие замещения одной этой аминокислоты в β^4 -цепи.

Известен и другой мутант, причем мутация, определяющая его, расположена в той же хромосоме, где локализован и ген серповидноклеточности. Этот мутант образует *гемоглобин С*, который отличается от гемоглобина А тем, что у него та же самая молекула глутаминовой кислоты в β^4 -цепи замещена на этот раз лизином. Другое генетическое изменение ведет к образованию еще одного типа гемоглобина, *гемоглобина G*. Аминокислоты во всех пептидах, полученных после обработки гемоглобина G трипсином, те же самые, что и у гемоглобина А, кроме седьмой от N-конца аминокислоты в пептиде 4. В этом случае глутаминовая кислота замещена глицином:

Вал — Гис — Лей — Тре — Про — Глу — *Гли* — Лиз...

В β -цепи в данном случае изменена аминокислота, занимающая другое положение. В *гемоглобине E* глутаминовая кислота, нормально найденная в положении 26 цепи β^4 (см. рис. 32—6), замещена лизином; вероятно, это единственное изменение в целой молекуле.

Приведенные данные показывают, что различные мутации ведут к замене отдельных аминокислот в различных участках β -цепи другими аминокислотами. Хотя генетическая основа для ряда мутаций еще точно не известна, имеются данные, позволяющие полагать, что все эти мутации локализуются в одной и той же хромосоме. Простейшим объяснением представляется следующее: β^4 -цепь определяется единичным геном, различные мутанты которого вызывают те или иные из перечисленных выше замещений различных аминокислот.

Наряду с уже описанными были найдены и другие типы гемоглобина А. В некоторых случаях изменена последовательность аминокислот в α -цепи, как в случае *гемоглобина I* (в котором изменение произошло в положении 16) и *гемоглобина «Horkins - 2»*. Гомозиготы в отношении гемоглобина А имеют молекулу $\alpha_2^A\beta_2^A$; гемоглобин гомозигот в отношении гена серповидноклеточности может быть записан как $\alpha_2^A\beta_2^S$, а молекула гемоглобина гомозигот в отношении образования гемоглобина I может быть записана как $\alpha_2^I\beta_2^A$. Список ряда химических вариантов Hb — А, определяемых генетически, дан на табл. 32—1. В каждом случае замещена одна какая-либо аминокислота.

Биохимическая генетика Hb — А подтверждает предположение, согласно которому, синтез глобина, неферментативного белка, определяется первичным действием гена. Пока еще трудно решить, участвует ли в синтезе гемоглобина А один или несколько генов. Существует следующий ряд доказательств, указывающих на независимую спецификацию α - и β -цепей:

1) му
S, C, E,
2) му
I и Норк
Друго
 α - и β -це
так и S-ге
телей име
А. Однак
гемоглоби
бин. Сле
бины, не
ны, так ка
отдельно,
точно бол
если и сце
дов можно
Две α -
у гетерози
шении мут
вполне вер
геном α^A (
ляемых ген
двух разли
бым из дву
но ожидает
четыре типа
это действи
1963).
Гемоглоб
в крови но

ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ВАРИАНТЫ Hb-A

| Тип Hb | Положение аминокис- лоты | Характер замены |
|--|--------------------------------|--------------------------|
| β-цепь S | | |
| C | 6 | Глу→Вал |
| G _{Сан-Хозе} | 6 | Глу→Лиз |
| E | 7 | Глу→Гли |
| M _{Саскатун} | 23 | Глу→Лиз |
| Цюрих | 63 | Гис→Тир |
| M _{Милуоки-1} | 63 | Гис→Арг |
| O _{Аравия} | 67 | Вал→Глу |
| D _{Пенджаб (-D_{Кипр})} | 121 | Глу→Лиз |
| | 121 | Глу→Глу-NH ₂ |
| α-цепь I | | |
| G _{Гонолулу} | 16 | Лиз→Асп |
| Норфолк | 30 | Глу→Глу-NH ₂ |
| M _{Бостон} | 57 | Глу→Асп |
| G _{Филадельфия (-G_{Азакуоли})} | 58 | Гис→Тир |
| O _{Индонезия} | 68 | Асп-NH ₂ →Лиз |
| | 116 | Глу→Лиз |

1) мутации, ведущие к изменениям в β-цепи (дающие гемоглобины S, C, E, G), не вызывают изменений в α-цепи;

2) мутации, которые ведут к изменению α-цепи (дающие гемоглобины I и Hopkins-2), не вызывают изменений в β-цепи.

Другое доказательство, согласующееся с независимой спецификацией α- и β-цепей, получено при изучении лиц, обладающих как Hopkins-2, так и S-гемоглобинами. Известно, что у таких индивидуумов один из родителей имеет гемоглобин такого же типа, а другой — нормальный гемоглобин A. Однако такие индивидуумы имеют потомство, которое образует либо гемоглобин типа Hopkins-2, но не S-гемоглобин, либо только S-гемоглобин. Следовательно, индивидуумы, имеющие Hopkins-2 + S-гемоглобины, не могут быть моногибридами. По-видимому, они дигибриды, так как аномальные гемоглобины встречаются у разных потомков как отдельно, так и вместе. Доля рекомбинантного потомства оказывается достаточно большой; следовательно, эти два локуса либо не сцеплены, либо, если и сцеплены, то их сцепление не очень тесное. Генотип таких дигибридов можно изобразить следующей формулой: $\alpha^{Hb-2} \alpha^A \beta^S \beta^A$.

Две α- и две β-цепи в определенной молекуле глобина идентичны даже у гетерозигот. Если Hopkins-2 + S-индивидуумы дигибриды в отношении мутаций, локализующихся в отдаленных друг от друга локусах, то вполне вероятно, что две α-цепи, определяемые геном α^{Hb-2} (т. е. α_2^{Hb-2}) или геном α^A (α_2^A), будут образовываться независимо от двух β-цепей, определяемых геном β^S (β_2^S) или геном β^A (β_2^A). Если это так, то любой продукт двух различных генов, определяющих α, должен быть сцепленным с любым из двух различных продуктов генов, определяющих β. Соответственно ожидается, что дигибриды, о которых шла речь, должны иметь все четыре типа глобина: $\alpha_2^{Hb-2} \beta_2^S$; $\alpha_2^{Hb-2} \beta_2^A$; $\alpha_2^A \beta_2^S$; $\alpha_2^A \beta_2^A$. Удалось показать, что это действительно так (H. A. Itano и E. A. Robinson, 1960; C. Baglioni, 1963).

Гемоглобин A₂. Тетрамер гемоглобина A₂(Hb — A₂), присутствующий в крови нормального взрослого человека, может быть разделен на два

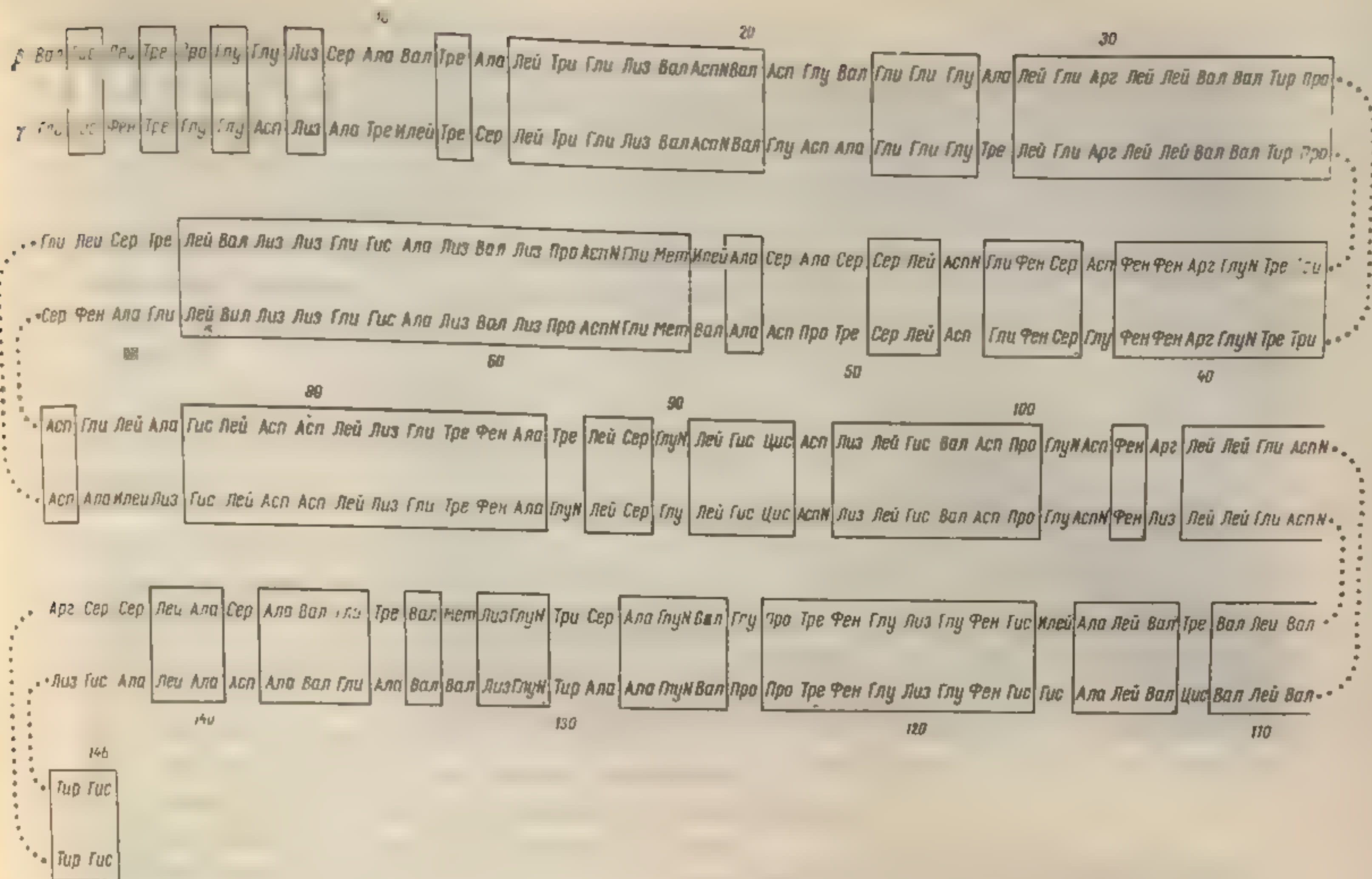


РИС. 32-7.

Последовательность аминокислот в пептидной β -цепи $Hb-A$ и γ -цепи $Hb-F$.
Остальные обозначения см. рис. 32—6 (V. M. Ingram)

еще далеко не полны; поэтому изучение точного относительного расположения различных генов весьма затруднено. По тем же причинам трудно изучить аллелизм гемоглобиновых мутаций, повреждающих одну и ту же цепь.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА¹

Миоглобин, белок мышц современных животных, состоит из одной цепи, содержащей 155 аминокислот, которая частично образует правовращающуюся α -спираль и несет на своей поверхности одну группу гема. При сравнении последовательности аминокислот миоглобина с последовательностью аминокислот α - или β -цепей гемоглобина были найдены многочисленные различия. Однако несмотря на эти различия, по длине цепи еще сохраняется ряд мест, где на обоих типах цепей встречаются одни и те же аминокислоты. Существованием такого сходства, вероятно, объясняется тот факт, что оба типа цепей одинаково расположены в трехмерном пространстве. Вполне возможно, что такое сходство частично (а возможно и полностью) обусловлено конвергентной эволюцией неродственных генов; однако сходство цепей можно объяснить также и тем, что гены, определяющие существующие теперь цепи, произошли от одного гена (рис. 32 — 8).

Согласно этой гипотезе, ген α , послуживший «предком», должен был иметь дубликацию в геноме, возникшую посредством одного из механизмов, обсуждавшихся в главе 12, так как современные виды обладают отдельными локусами, осуществляющими контроль за образованием миоглобина и гемоглобина. Последующие мутации одного из двух генов дуп-

¹ См. работы В. Ингрема (1961) и С. Анфинсена (1959).

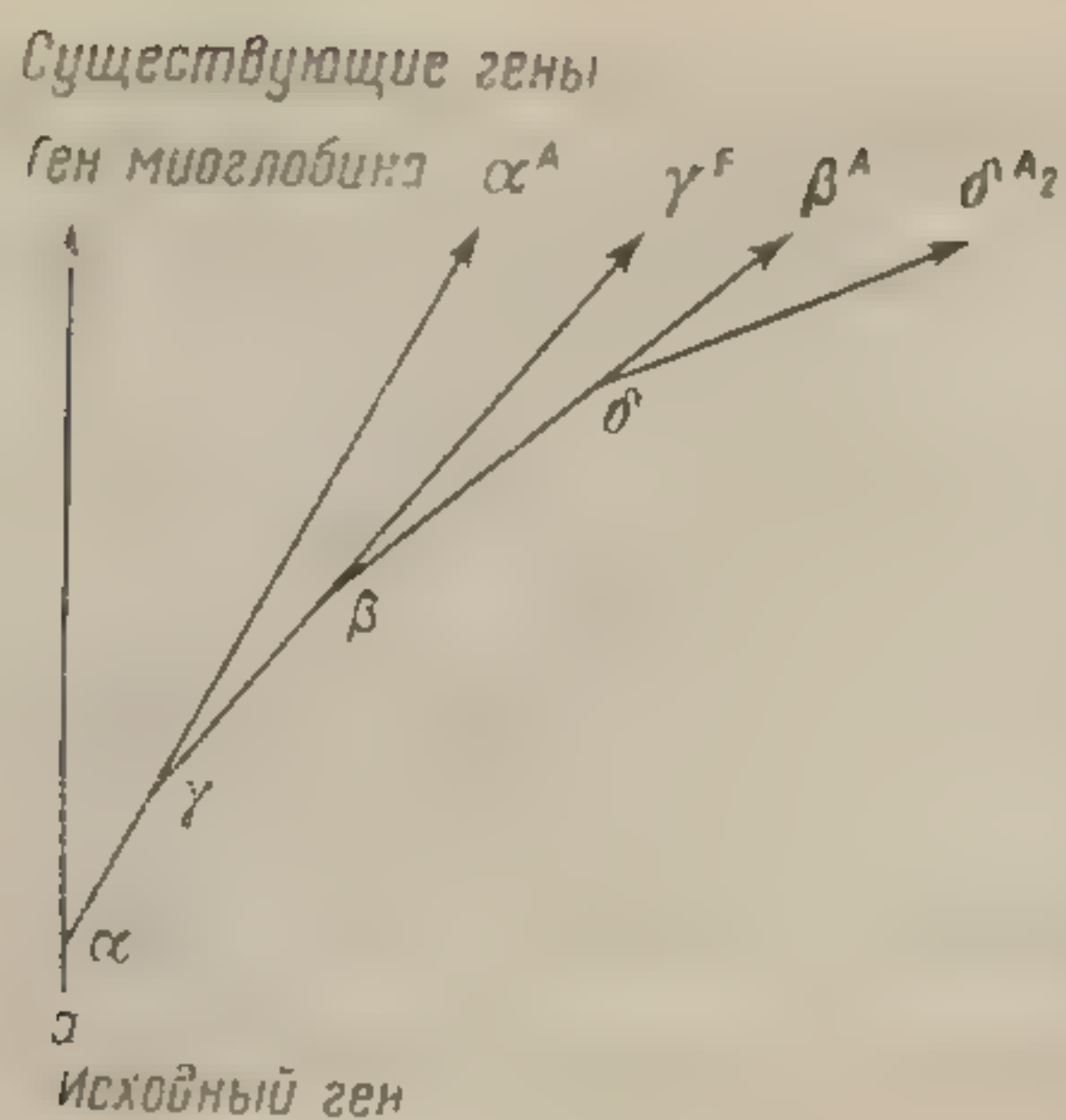


РИС. 32-8.

Схематическое изображение гипотезы, предполагающей дупликацию гена и внутригенное мутирование для объяснения молекулярной эволюции миоглобина и гемоглобина

продукт которого способен образовывать димер; отметим, что димеризация повышает эффективность α -цепей как носителей кислорода. Далее, допустим, что α -локус удвоился и что один из образовавшихся локусов мутировал к γ , контролирующему образование γ -цепей, которые, в свою очередь, образуют не только димеры, но также тетрамеры с α -димерами. Тетрамером должен быть эмбриональный гемоглобин $\alpha_2\gamma_2$. Тетрамерный гемоглобин, по-видимому, более эффективен, чем димерный гемоглобин.

Из какого гена, α или γ , возник ген, определяющий образование β -цепей? Известно, что β^A -цепь отличается как от α^A -, так и γ^F -цепей примерно 21—23 аминокислотами; поэтому трудно сказать, какой из последних двух типов был исходным для гена β -цепи. Было открыто много мутаций, затрагивающих как α -, так и β -цепи, однако в популяции с заметной частотой встречаются лишь мутации, влияющие на β -цепь. Эти данные вместе с упоминавшимися ранее данными о сходстве α -цепей у позвоночных позволяют предполагать, что в тетрамере более невыгодные условия создаются в результате изменения в α -димере, чем при изменении β -цепи. Напомним, что изменение в гене α^A модифицирует гемоглобины как эмбриона, так и взрослого индивидуума. Возможно также, что определенные изменения α -цепи вызывают потерю способности образовывать тетрамеры. Гомотетрамер α , α_4^A , возможно, не способен существовать, хотя β -цепи могут образовывать β_4^A , а γ -цепи способны образовывать γ_4^F . На основании этих рассуждений мы можем заключить, что ген β представляет, по-видимому, один из двух продуктов дупликации γ -гена.

Как уже указывалось ранее, цепи β^A и δ^A отличаются менее чем 10 аминокислотами. По-видимому, в геноме произошла дупликация β -гена, и один из двух образовавшихся генов вследствие мутации становится δ -геном: реальность такой дупликации недавно была подтверждена обнаружением незначительных различий по аминокислотам между β^A и δ^A -цепями, а также данными о сцеплении генов β^A и δ^A и об ограниченной встречаемости A_2 -подобного гемоглобина у приматов. Суммируя все вышесказанное, следует указать, что вероятно посредством генной дупликации и внутренних мутаций исходный ген α дал начало, с одной стороны, гену, контролирующему образование миоглобина, а с другой — после-

ликации могли привести к образованию того локуса, который в настоящее время контролирует образование миоглобина, тогда как мутации в другом гене обусловили появление локуса, связанного с образованием цепей гемоглобина. Такая гипотеза подтверждается данными, показывающими, что гемоглобин миоглобин содержит одну полипептидную цепь с молекулярным весом около 17 000, а гемоглобин миксинны представляет собой, по-видимому, подобный мономер или, возможно, димер с молекулярным весом около 34 000.

Все известные гемоглобины позвоночных, за исключением миоглобина, имеют цепь, которая начинается с последовательности Вал — Лей, поэтому все они могут быть продуктами мутантных α . Соответственно предполагается, что исходным геном для гемоглобина был ген α , после того как он образовался, он мутировал в аллель, полипептидный

довательно по-видимому их должно основ эволю

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биохимическая плазма, ко- Биохимический анализ разветвленного логическим, такой разветвления все гены и все гены

Исследованиями аллели к появлению функции на Изучение

что гены контролируют влияя на ферменты составляет собой

На основании «один ген — только одной результатом ложена частота подтвержденности (в отношении роста) у *Neurospora*

Биохимический бина у человека



ГАРРИЕТ ЭФРУССИ-ТЕЙЛОР,
БОРИС ЭФРУССИ И ЛЕО СЦИЛАРД
(1951 г.)

довательности генов $\alpha \rightarrow \gamma \rightarrow \beta \rightarrow \delta$. Так как полипептиды являются, по-видимому, первичными продуктами деятельности генов, то изучение их должно в значительной мере способствовать пониманию молекулярных основ эволюции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биохимическая активность, необходимая для существования протоплазмы, контролируется ядром, точнее генами, которые содержатся в нем. Биохимические реакции происходят в последовательности, которая образует разветвленные метаболические пути, ведущие к химическим, физиологическим, морфологическим, возрастным проявлениям фенотипа. В силу такой разветвленности метаболических путей большинство, а возможно и все гены имеют плеiotропный эффект.

Исследование фенотипических различий, обусловливаемых различными аллелями, и прослеживание всего пути вплоть до гена, приводящего к появлению таких различий, показывает, что гены проявляют свои функции на метаболическом уровне.

Изучение врожденных ошибок метаболизма у человека показывает, что гены контролируют различные ступени в биохимических процессах, влияя на ферменты; и в этих случаях такое влияние, по-видимому, представляет собой первичный и единственный результат деятельности гена.

На основании этих экспериментальных данных предлагается гипотеза «один ген — один первичный эффект», согласно которой ген обладает только одной первичной функцией и любая первичная функция является результатом действия одного гена. Для проверки общей гипотезы предложена частная гипотеза «один фермент — один ген», которая получила подтверждение в биохимических и генетических исследованиях ауксотрофности (в отношении витамина B_1 , триптофана, аденина и других факторов роста) у *Neurospora*.

Биохимическая генетика триптофансинтетазы у *E. coli* и гемоглобина у человека показала, что гипотеза «один фермент — один ген» долж-

на быть уточнена и сформулирована как гипотеза «один полипептид — один ген».

Таким образом, аминокислотный состав каждого полипептида полностью определяется первичным действием одного гена. Следовательно, подтверждается и гипотеза «один ген — один первичный эффект», и можно заключить, что один из способов первичного действия гена — это определение аминокислотного состава полипептида. Результаты этих исследований открывают путь для изучения эволюции на биохимическом уровне в частности, молекулярной эволюции гемоглобина.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

32.1. Перечислите пять болезней человека, вызываемых врожденными ошибками метаболизма.

32.2. В каком случае можно излечить врожденную ошибку метаболизма?

32.3. Все ли мутации приводят к врожденным ошибкам метаболизма? Объясните.

32.4. Какие Вы можете привести доказательства того, что гены контролируют различные этапы биосинтетической реакции?

32.5. Существует ли в какой-то мере зависимость между изучением мутаций и представлением о функциональной генетической единице? Объясните.

32.6. Считаете ли Вы, что доказательство гипотезы «один ген — один первичный эффект» добавило бы что-либо к нашим представлениям о химических свойствах гена? Объясните.

32.7. С помощью каких исследований — морфологических, физиологических или биохимических — можно получить наиболее полную информацию о гене? Почему?

32.8. Считаете ли Вы, что концепция о функциональной единице имеет какое-то значение для практической медицины? Объясните.

32.9. Какая связь и зависимость существует между изучением функциональной генетической единицы и изучением генетических единиц мутации и рекомбинации?

32.10. Какое значение имеет тот факт, что глутаминовая кислота в гемоглобине А замещена другими аминокислотами (валином, лизином или глицином) в гемоглобинах S, C, G и E? Объясните.

32.11. Почему человек представляет собой малоудобную модель для генетического исследования?

32.12. Составьте план эксперимента для определения кроссинговера в пределах одного гена, используя в качестве объекта исследования *Neurospora*.

32.13. Можно ли считать гипотезу «один ген — одна первичная функция» эквивалентной гипотезе «один полипептид — один ген»? Почему?

32.14. Какие Вы можете привести возражения против гипотезы, предполагающей, что функциональная генетическая единица эквивалентна одной генетической единице рекомбинации?

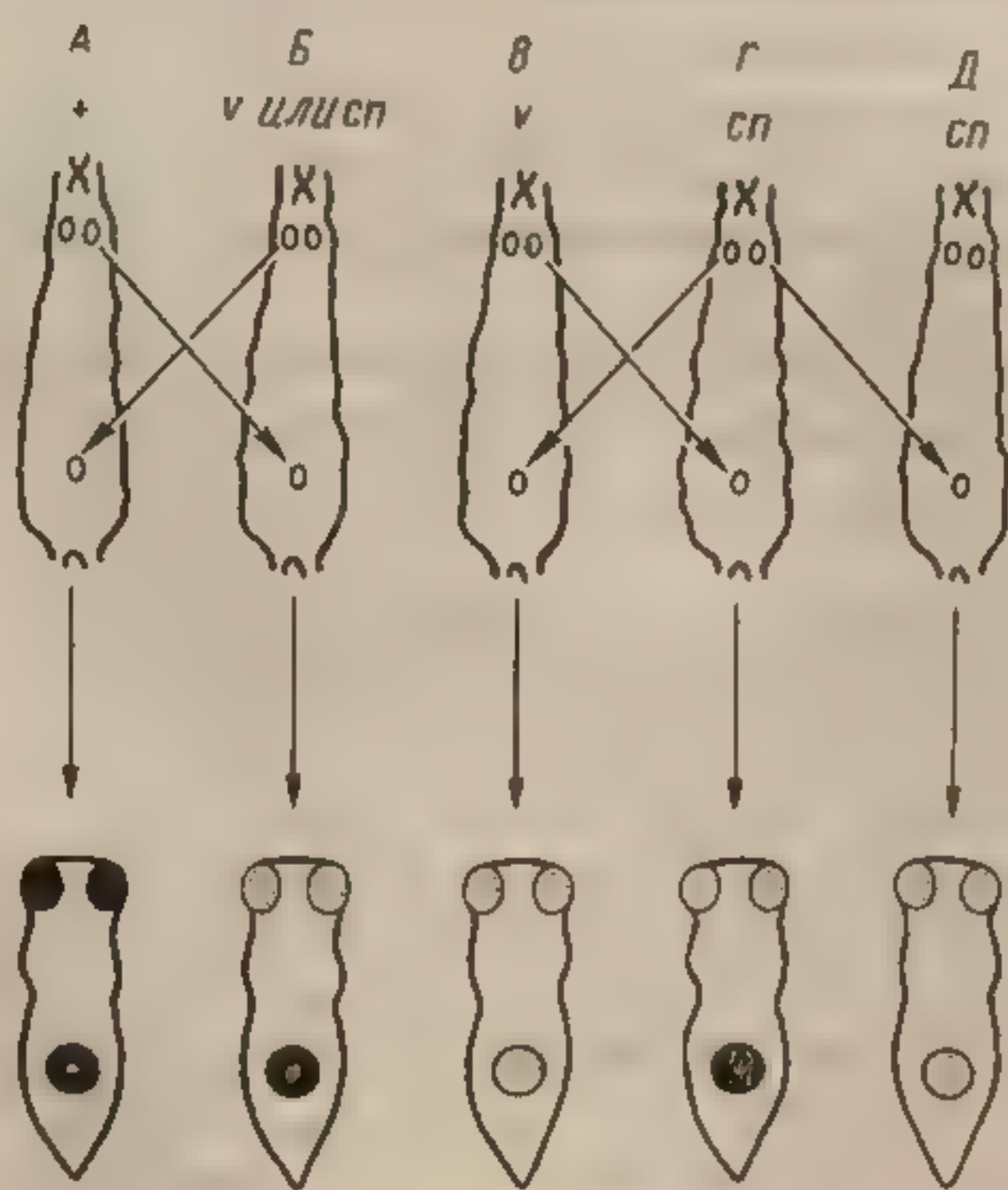


РИС. 32-9.

Последствия трансплантации закладки глаза (к вопросу 32.21)

32. вичной

женны

32.

едини

кисло

полож

32.1

шение

32.1

функц

бинаци

32.1

что бо

мальны

а не в

32.2

синтеза

обнаруж

32.21

зачатко

гомозиг

ярко-кр

к образо

Можете

относите

вого пи

ЛИТЕРА

С. В. Ан

Молек

С. Baglion

1963, 1

G. W. Bead

Proc. N

J. A. I

A. G. Bear

D. M. Bon

G. Guidotti,

globin.

H. Harris.

D. Y.-Y. H

Human Gene

V. M. Ingra

ted in:

H. A. Itano

Proc. N

J. S. Kendr

1963, 1

W. E. Nanc

R. P. Wagn

C. Yano/sky

and Sup

Escherich

on Bacte

32.15. Полагаете ли Вы, что химическое вещество, определяемое первичной деятельностью гена, должно быть составлено из линейно расположенных частей? Почему?

32.16. Можно ли применить термин «цистрон» к одной или нескольким единицам рекомбинации, которые определяют какую-либо из аминокислот (глутаминовую кислоту или лизин), занимающую определенное положение в молекуле гемоглобина? Почему?

32.17. Какова функция генов? Имеет ли Ваш ответ какое-либо отношение к концепции гена? Объясните.

32.18. Правильнее ли использовать термин «аллель» для определения функциональных генетических единиц, а не генетических единиц рекомбинации? Объясните.

32.19. Какие выводы можно сделать на основании того наблюдения, что большинство аминокислотных замещений, происходящих в ненормальных гемоглобинах, по-видимому, чаще имеют место на поверхности, а не внутри свернутой молекулы гемоглобина?

32.20. Как можно объяснить данные, показывающие, что во время синтеза гемоглобина после кратковременной обработки изотопом Fe^{59} обнаружено включение изотопа в $Hb - A$ и $Hb - A_2$, но не в $Hb - A_3$?

32.21. Как показано стрелками в верхнем ряду (рис. 32—9), пересадки зачатков глаза (имагинальных дисков) между личинками *D. melanogaster*, гомозиготными в отношении генов красного цвета глаз (+) или генов ярко-красного цвета (vermillion, v) или cinnabar (cn) — приводит к образованию взрослых особей с цветом глаз, указанным в нижнем ряду. Можете ли Вы на основании этих результатов сделать какие-либо выводы относительно биохимических реакций, ведущих к образованию коричневого пигмента глаз?

ЛИТЕРАТУРА

- C. B. Anfinsen. The Molecular Basis of Evolution.— N. Y., 1959. (К. Анфинсен. Молекулярные основы эволюции. М., ИЛ, 1962).
- C. Baglioni. Correlations between Genetics and Chemistry of Human Hemoglobins.— 1963, p. 405. In: Molecular Genetics, Part I. J. H. Taylor (Ed.). N. Y.
- G. W. Beadle and E. L. Tatum. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1941, 27, 499. Reprinted in «Classic Papers in Genetics», J. A. Petes (Ed.). 1959, p. 166.
- A. G. Bearn. The Chemistry of Hereditary Disease.—Scient. Amer., 1956, N 195, 126.
- D. M. Bonner, and S. E. Mills. Heredity. 2nd ed., 1964.
- G. Guidotti, W. Konigsberg and L. C. Craig. On the Dissociation of Normal Adult Hemoglobin.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 774.
- H. Harris. Human Biochemical Genetics. Cambridge, 1959.
- D. Y.-Y. Hsia. Inborn Errors of Metabolism. Chicago, 1959.
- Human Genetics. In: Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. biol., 1965, 29.
- V. M. Ingram. Gene Evolution and the Haemoglobins.— Nature, 1961, 189, 704. Reprinted in: Papers on Human Genetics, S. H. Boyer, IV (Ed.), 1963, p. 164.
- H. A. Itano and E. A. Robison. Genetic Control of α - and β -Chains of Hemoglobin.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 1492.
- J. S. Kendrew. Myoglobin and the Structure of Proteins.—Nobel Prize Talk, Science, 1963, 193, 1359.
- W. E. Nance. Genetic Control of Hemoglobin Syntheses.—Science, 1963, 141, 123.
- R. P. Wagner and H. K. Mitchell. Genetics and Metabolism, 2nd ed. N. Y. 1964.
- C. Yanofsky and L. P. Crawford. The Effects of Deletions, Point Mutations, Reversions and Suppressor Mutations on the Two Components of the Tryptophan Synthetase of *Escherichia coli*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1959, 45, 1016. Reprinted in: Papers on Bacterial Genetics, E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 384.

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ И РНК

Обмен веществ регулируется главным образом белками, которые несут как структурные функции (образование субклеточных органелл), так и каталитические (образование ферментов). Таким образом, если структура и функции организма зависят от белка, то неудивительно, что основная задача генов заключается в определении специфического состава аминокислот в полипептидах (глава 32).

Обратим наше внимание на ДНК, представляющую собой генетический материал большинства организмов. Что должна делать ДНК или что нужно с ней сделать, чтобы в результате образовались специфические полипептидные цепи? Поскольку мы имеем дело с «консервированной» ДНК (conserved DNA), т. е. ДНК, которая все время находится в хромосоме или другой структуре, то очевидно, любая ДНК должна действовать *in situ*. Так как ДНК не белок, она не может быть ферментом и, вероятно, не может служить катализатором при образовании полипептидов. Однако ДНК вероятно может служить матрицей при определении специфичности полипептида. РНК менее стабильна, чем ДНК, из-за того, что рибоза более реакционноспособна, чем дезокси-Д-рибоза. Следовательно, будучи более инертной, ДНК представляет собой более стабильную матрицу, чем РНК.

Мы уже знаем, что после разделения нитей ДНК каждая из них служит матрицей при образовании комплементарной нити. Если ДНК используется как матрица также и при функционировании генов, то четыре разных основания (А, Т, Г и Ц), обычно обнаруживаемые в ДНК, должны участвовать в определении природы образующихся матриц. Другими словами, информация для генетического определения специфичности полипептидов матричным механизмом должна была бы содержаться в основаниях ДНК. В конечном счете, природа полипептидов зависит от их аминокислотного состава. Во многих полипептидных цепях содержатся все 20 обычно встречающиеся в организмах аминокислоты, каждая по одному или более раз (см. рис. 32—4); кроме того, в полипептидах варьирует число и последовательность этих строительных блоков. Поскольку и полипептиды и ДНК являются линейными структурами, можно относительно легко представить себе механизм, с помощью которого последовательность нуклеотидов ДНК служит матрицей для определения специфической последовательности аминокислот.

РИБОСОМЫ¹

Синтез гемоглобина происходит в цитоплазме красных кровяных телец млекопитающих — клетках, которые утратили ядро. Так как цитоплазма в этом случае является единственным местом синтеза белка, то следует детально рассмотреть структурные компоненты цитоплазмы. Во всех исследованных клетках — растительных, животных и микробных — на электронных микрофотографиях цитоплазмы видны много-

¹ Новые данные о структуре и функции рибосом можно найти в книге А. С. Спирина и Л. П. Гавриловой «Рибосома» (Изд-во «Наука», 1968, М.). — Прим. перев.

численные тельца, называемые *рибосомами* (см. рис. 1—3 и Приложение IX, рис. 2). Их особенно много в клетках, активно синтезирующих белок, они обнаруживаются также в ядре и хлоропластах. Рибосомы, выделенные из разрушенных клеток, могут быть охарактеризованы по скорости седиментации, измеряемой в ультрацентрифуге и выражаемой в *единицах седиментации*, *s*. Чем меньше величина *s*, тем меньше частица, хотя эта зависимость не линейна; следовательно, величина *s* отражает размер рибосомы. У *E. coli* имеется четыре рибосомных компонента: 30s, 50s, 70s и 100s. Основными компонентами являются 30s и 50s, а более крупные частицы складываются из этих основных, как показано на рис. 33—1. Обе частицы (30s и 50s) содержат 64% РНК и 36% белка (по весу). (Рибосомы животных содержат 50% РНК.) Мелкие частицы агрегируют с образованием более крупных при добавлении ионов магния или других двувалентных катионов. Рибосомы млекопитающих ведут себя так же, хотя их основные компоненты, 40s и 60s, несколько больше по размерам, чем соответствующие частицы у *E. coli*. 80s — частица млекопитающих (гомологичная 70s — частице *E. coli*) образуется в результате соединения одной 40s-рибосомы и одной 60s-рибосомы.

Около 80% клеточной РНК находится в рибосомах. (Сообщалось, что небольшие количества РНК содержатся также и в митохондриях.) Рибосомная РНК состоит из одной нити и имеет относительно высокий молекулярный вес: $0,55 \pm 0,10 \times 10^6$ для 16s-компонента 30s-частицы и $1,15 \pm 0,20 \times 10^6$ для 23s-компонента 50s-частицы; в 16s- и 23s- РНК содержится соответственно около 1000 и 2000 нуклеотидов. Однако 23s РНК не представляет собой димера, состоящего из двух 16s РНК, поскольку состав этих компонентов определяется различными участками генома (S. Jankovsky and S. Spiegelman, 1963; S. Spiegelman, 1964). Кроме того, рибосомная РНК значительно легче образует комплексы с гомологичной денатурированной ДНК, чем с чужеродной, что позволяет считать, что рибосомная РНК различных организмов различается если не по составу оснований, то по их последовательности.

Синтезы РНК некоторыми вирусами млекопитающих и обоих компонентов РНК (18s и 30s) в клетках млекопитающих характеризуются одним общим свойством: как репликация вирусной РНК, так и синтез рибосомной РНК подавляется *пурамицином*. Однако такие вирусы, содержащие РНК, как ВТМ, представляют собой рибонуклеопротеиды, белковый





| | | | | |
|---------------------------|---|---|---|---|
| Целая частица |  |  |  |  |
| Размер | 2(30s) | + | 2(50s) \rightleftharpoons | 2(70s) \rightleftharpoons 1(100s) |
| Мол вес ($\times 10^6$) | $0,85 \pm 0,15$ | | $1,80 \pm 0,15$ | $2,8 \pm 0,2$ $5,9 \pm 1,0$ |
| РНК рибосом | | | | |
| Размер | 16s | | 23s | |
| Мол вес ($\times 10^6$) | $0,55 \pm 0,10$ | | $1,15 \pm 0,20$ | |

РИС. 33-1.

Свойства рибосом *E. coli*

компонент которых состоит из большого числа идентичных субъединиц (см. рис. 28—2). В то же время 30s-рибосома содержит 10 полипептидных цепей со средним молекулярным весом 30 000, причем очень возможно, что все они разные. Несомненно, что белковая структура рибосом сложнее, чем структура РНК-содержащих вирусов.

После введения в тело животного меченых аминокислот можно через разные промежутки времени исследовать ткани, которые активно синтезируют белок¹. Когда вводится большая доза меченых аминокислот, рибосомы метятся почти сразу. Можно ожидать, что при введении небольшого количества меченых аминокислот, они будут быстро использоваться при синтезе белка; действительно, рибосомная метка сначала быстро растет, а затем падает. В конечном итоге меченые аминокислоты, пройдя через рибосомы, включаются в белки, например в гемоглобин. Эти опыты совершенно ясно показывают, что рибосомы связаны с синтезом белка. Поскольку обнаружено, что последовательность аминокислот в гемоглобине определяется прежде всего функционирующими генами, состоящими из ДНК (глава 32), необходимо объяснить, каким образом матрица ДНК, остающаяся в ядре ретикулоцита, определяет последовательность аминокислот в гемоглобине, который образуется в цитоплазме. Ясно, что если в этом случае ДНК функционирует как матрица, то она должна действовать непрямым путем.

Возможно, ДНК участвует в образовании другой матрицы, которая не является ни белком, ни ДНК, но может из ядра перейти в цитоплазму, где она будет использоваться для синтеза белка. Этому условию удовлетворяет РНК, будучи нуклеиновой кислотой также с четырехбуквенным кодом (А, У, Ц и Г), в котором урацил (У) занимает место тимина (Т). Такой механизм непременно требует, чтобы четырехбуквенный код ДНК был прямо переведен (транскрибирован) в четырехбуквенный код РНК, т. е. обязательно возникает проблема *транскрипции*. Этот механизм также обязательно требует, чтобы РНК несла информацию, переводимую в полипептидную последовательность, — т. е. возникает и проблема *трансляции*. Следовательно, сложная гипотеза предполагает, что *нуклеотидная последовательность ДНК транскрибируется в нуклеотидную последовательность РНК, которая, в свою очередь, транслируется в последовательность аминокислот*.

ИНФОРМАЦИОННАЯ РНК

В обычных условиях значительное количество РНК (если не вся РНК) синтезируется у высших организмов в хромосомах и затем переходит в ядрышко². Если использовать радиоактивную метку, то со временем можно обнаружить переход РНК и в цитоплазму. С другой стороны, нет никаких данных о том, что РНК из цитоплазмы переходит в ядро. Эти результаты согласуются с обсуждаемой гипотезой.

Связь между синтезом РНК и ДНК можно изучить у бактерий. В бактериях после заражения фагами, содержащими ДНК, синтезируется РНК, которая по составу оснований отличается от ДНК хозяина. РНК, образовавшаяся после заражения фагом, отличается от РНК, синтезированной перед заражением. Состав оснований этой РНК зависит от фага, поскольку с денатурированной ДНК фага спаривается *in vitro* только РНК, синтезированная после заражения, образуя двойные гибридные нити — одна нить РНК и одна — ДНК. (Гибридные молекулы РНК —

¹ Следующие данные основаны на работах Ф. К. Замечника и сотрудников, а также М. Рабиновича и М. Е. Олсона.

² В настоящее время показано, что РНК может синтезироваться в митохондриях при участии митохондриальной ДНК (Rabinovitz M. и др. Proc. Nat. Acad. Sci. 1965, 53, № 5). — Прим. перев.

ДНК имеют отличающийся удельный вес, и поэтому их можно идентифицировать в пробирке после ультрацентрифугирования; они также относительно устойчивы к действию РНКазы.) Кроме того, новообразованная ядерная РНК нормальных клеток может образовывать комплекс с дезоксирибонуклеопротеидом хромосом, как показали Дж. Боннер, Р. Ц. Хуанг и Н. Магешвари (1961). Такие результаты заставляют предполагать существование прямой зависимости каждого основания синтезирующейся в ядре РНК от одного основания ядерной ДНК.

Как уже упоминалось, после заражения хозяина фагом, содержащим ДНК, образуется РНК, комплементарная фаговой ДНК. Найдено, что эта фагоспецифичная РНК присоединяется к небольшой части уже имеющихся рибосом, что позволяет считать, что по крайней мере некоторые рибосомы не несут все время матричной РНК (образованной на ДНК-матрице), содержащей информацию для определения специфической последовательности аминокислот. Такие рибосомы могут получать участки РНК, несущие информацию для создания фагоспецифических полипептидов. Таким образом, синтезируется особый тип РНК, называемой *информационной (messenger) РНК*, или *мРНК*. мРНК несет от фаговой ДНК к рибосоме информацию, необходимую для осуществления действия генов. Вероятно, информационная РНК приводит к сборке различных аминокислот на рибосоме, где они соединяются, образуя полипептиды. Информационная РНК также содержится и функционирует в нормальных, незараженных клетках. Генетический материал фага MS2, содержащего РНК и заражающего *E. coli*, сохраняется в процессе всех репликаций (осуществляемых РНК-синтетазой) и трансляций (здесь он служит информационной РНК), которые имеют место в течение цикла развития до лизиса, как показали А. Г. Дуа и С. Спигелман (1963).

Матрицей для образования информационной РНК может быть ДНК, локализованная в цитоплазме; так, например, действует ДНК вируса оспы в культуре клеток человека (J. Becker and W. Joklik, 1964).

СИНТЕЗ ИНФОРМАЦИОННОЙ РНК

Как синтезируется информационная РНК? ДНК может реплицироваться *in vitro* в отсутствие РНК; такая репликация вероятно также происходит в ядре, хотя здесь могут иметь место неуловимые, вторичные взаимодействия с РНК или белком. Приведенные данные доказывают, что синтез мРНК тесно связан с ДНК. Благодаря работам Дж. Гурвитца, А. Стивенса, С. Б. Вейса, их коллег и других обнаружено, что в ядре в норме содержится необходимый для синтеза РНК фермент, *зависящий от ДНК: РНК-полимераза*. Этот ферментативный синтез РНК может быть осуществлен *in vitro*. Он требует присутствия как ДНК, так и всех четырех рибозидтрифосфатов. Синтезированная в определенных условиях РНК имеет тот же состав оснований, что и ДНК, служащая первичной матрицей (конечно, за исключением того, что урацил заменяет тимин). Эта ситуация напоминает синтез ДНК, когда ДНК-полимераза использует одностратчатую ДНК. Однако *in vitro* при образовании РНК-полимера двунитчатая ДНК является более эффективной затравкой, чем одностратчатая ДНК.

В зрелом фаге φX174 ДНК находится в виде одностратчатого кольца. При заражении *E. coli* репликативная форма (RF) фага φX174 представлена двунитчатой спиралью ДНК, замкнутой в кольцо. Если двунитчатое кольцо разорвано, то *in vitro* РНК-полимераза образует РНК, комплементарную обоим нитям фрагментов ДНК. Однако, если фаговую ДНК экстрагировать осторожно, так, чтобы кольцо не разрывалось, то тогда только одна из двух нитей ДНК служит матрицей. Более того, *in vivo* и *in vitro* обнаружено, что та же нить кольцевой ДНК, которая служит

матрицей для РНК-полимеразы, используется и при образовании однонитчатой ДНК, входящей в состав зрелого фага. Эти данные не только подтверждают наличие *транскрипции одной из комплементарных нитей*, но и указывают на то, что, по крайней мере в этом случае, механизмы, контролирующие синтезы, требуют присутствия интактной двунитчатой ДНК в виде кольца (S. Spiegelman и соавторы, 1963, 1964; M. Green, 1964).

Не вся РНК образуется на ДНК-матрице. Мы уже отмечали (стр. 380), что *in vivo* РНК-синтетаза использует как матрицу вирусную РНК для образования комплементарной РНК. Более того, *in vitro* гомополирибонуклеотиды, содержащие А, У и Ц, также могут служить матрицами при синтезе комплементарной РНК с помощью РНК-полимеразы (J. Krakow а. S. Ochoa, 1963).

В низких концентрациях *актиномицин Д* связывается с участками ДНК, содержащими гуанин, тем самым избирательно подавляя синтез информационной РНК с помощью РНК-полимеразы. Подавление синтеза ДНК также имеет место, но при значительно больших концентрациях. Экспериментальные данные позволяют предполагать (E. Reich, 1964), что:

- 1) актиномицин укладывается в малый желобок ДНК;
- 2) малый желобок служит специфическим матричным центром для РНК-полимеразы, зависящей от ДНК;
- 3) большой желобок служит местом действия ДНК-полимеразы.

РИБОСОМНАЯ РНК

Поскольку типичная хромосома высших организмов содержит РНК, то какое-то количество новосинтезированной ядерной РНК становится частью родительских и дочерних хромосом. Однако большая часть новообразованной РНК уходит из хромосом и используется, по-видимому, в основном при образовании новых рибосом. Опыты с *Bacillus megaterium* доказывают, что разным компонентам рибосомной РНК (16s и 23s) комплементарны разные участки ДНК (S. Spiegelman, 1964). Целиком достроенные рибосомы не присоединяют больших количеств новообразованной РНК; однако опыты с меткой позволили показать, что незначительный обмен РНК происходит и в достроенных рибосомах. Этой обменивающейся РНК является информационная РНК. Таким образом, основная часть РНК рибосом — *рибосомная РНК* — обычно включается в рибосомы во время их образования. Механизм, с помощью которого РНК включается в новые рибосомы, образуя рибонуклеопротеид, пока еще не известен.

В диплоидных клетках жабы *Xenopus laevis* обычно содержится два ядрышка. Рецессивный летальный мутант, называемый *безъядрышковым*, имеет в гетерозиготном состоянии одно ядрышко и ни одного в гомозиготном, причем в этом случае мутант содержит много мелких ядрышковых «шариков» вместо типичных ядрышек. Очевидно, мутация затрагивает ядрышковый организатор [данные Д. Д. Брауна и Дж. Б. Гурдона (1964), а также И. Г. Мак Конкей и Дж. В. Гопкинса (1964)] — область хромосомы, ответственную за образование ядрышка (стр. 19). Гомозиготный мутант также не может синтезировать рибосомную РНК (18s и 28s), хотя продолжает синтезировать ДНК, небольшие молекулы РНК (4s) и, возможно, другие типы РНК. Гомозиготные мутанты, так же как и нормальные гомозиготы, сохраняют и, по-видимому, используют рибосомы, получаемые из яйцеклетки. Гетерозигота образует такое же количество рибосомной РНК (18s и 28s), как и нормальная гомозигота. Так как два типа рибосомной РНК отличаются по составу оснований, то они, вероятно, образуются разными последовательностями ДНК. Однако синтез обоих типов прекращается в результате одной мутации, молекулярная природа которой неизвестна.

По-в
посколь
близител
с безъяд
связаны
генетиче
рышками
нагреван
с рибосом
о том, чт
лементар

ТРАНСПО

Как уже
молекула
содержит
примерно
Поскольку
при центр
она назыв
образуется
ных (ради
ты к рибо
креплена
молекул р
ном, а дру
вания диф
находятся
приложени
то она долж
ние IV, р
сходную ко
большинств
В структур
концы моле
жится окол
Вычислено,
гиба шпиль
трех неспа
Все молеку
наковые раз
ширину 20 А
других отно
по их внутре
по составу о
последователь
различных т
из них способ
одну из амино
чающихся в

1 Последователь
скольких тРНК
структуру пр
не как шпиль
го листа» (На
Прим. перев.

По-видимому, многие гены участвуют в синтезе рибосомной РНК, поскольку и у бактерий и у мыши рибосомная РНК комплементарна приблизительно 0,6% дезоксирибонуклеотидных пар. Результаты опытов с безъядрышковыми мутантами позволяют считать, что эти гены тесно связаны друг с другом, и регуляция может меняться при изменении одного генетического локуса. Недавно удалось выделить ДНК, связанную с ядрышками культивируемых *in vitro* клеток HeLa, и денатурировать ее нагреванием. Такая однонитчатая ДНК образует молекулярные гибриды с рибосомной РНК. Этот факт (вместе с другими данными) свидетельствует о том, что в области организатора ядрышка концентрируется ДНК, комплементарная рибосомной РНК.

ТРАНСПОРТНАЯ (РАСТВОРИМАЯ, ИЛИ АДАПТЕРНАЯ) РНК

Как уже отмечалось, рибосомная РНК обладает относительно высоким молекулярным весом (от полумиллиона до одного миллиона). В цитоплазме содержится другой тип РНК, с относительно низким молекулярным весом, примерно равным 18 000, что приблизительно соответствует 67 нуклеотидам. Поскольку, в отличие от рибосомной РНК, эта РНК не осаждается при центрифугировании вместе со структурными элементами клетки, она называется *растворимой РНК*, или тРНК. Вероятно, тРНК также образуется в ядре (M. Chirchase and M. Birnstiel, 1963). С помощью меченых (радиоактивных) аминокислот можно показать, что аминокислоты к рибосомам поступают по одной, причем каждая аминокислота прикреплена к молекуле растворимой РНК. Концевые нуклеотиды у всех молекул растворимой РНК одинаковы, один конец оканчивается гуанином, а другой — последовательностью оснований — Ц—Ц—А. Исследования дифракции рентгеновых лучей показывают, что молекулы тРНК находятся в основном в состоянии двойной спирали (G. Zubay, 1963, приложение IV). Так как каждая молекула тРНК состоит из одной нити, то она должна иметь форму скрученной «шпильки» (рис. 33—2 и приложение IV, рис. 12) или какую-то сходную конфигурацию, в которой большинство оснований спарены. В структуру «шпильки» не входят концы молекулы, в которых содержится около 30 пар оснований. Вычислено, что в образовании изгиба шпильки участвуют не менее трех неспаренных нуклеотидов. Все молекулы тРНК имеют одинаковые размеры: длину 100 Å и ширину 20 Å. Различаются они в других отношениях, по-видимому, по их внутренним свойствам, т. е. по составу оснований или их последовательности, образуя около 20 различных типов, причем каждая из них способна переносить только одну из аминокислот, обычно встречающихся в белках¹. Вероятно,

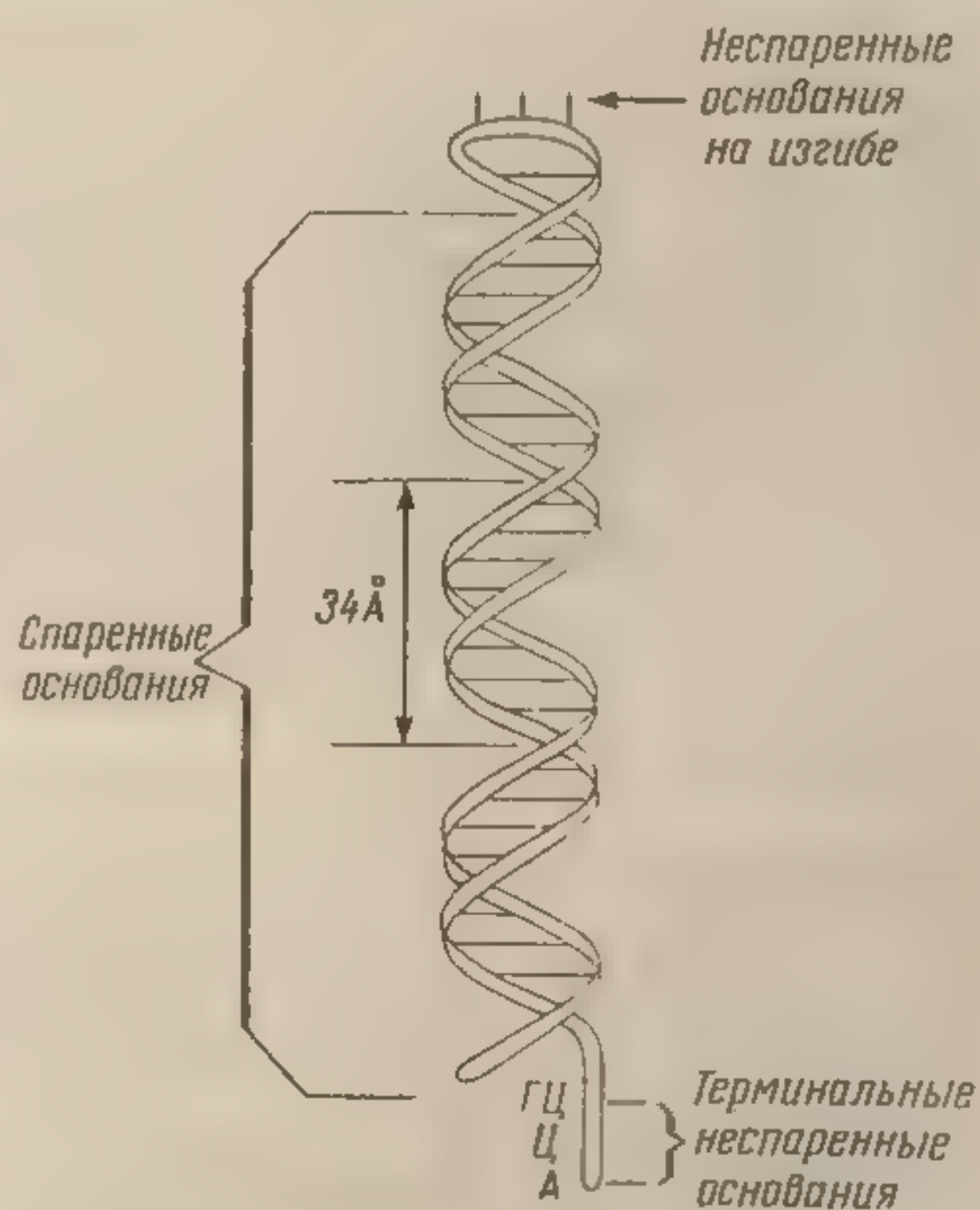


РИС. 33-2.

Предполагаемая структура адаптерной РНК

¹ Последовательность нуклеотидов нескольких тРНК расшифрована и ее структуру представляют чаще всего не как шпильку, а в виде «клеверного листа» (Nature, 1967, 215, 817).— Прим. перев.

растворимые РНК разных видов отличаются по нуклеотидной последовательности, так как тРНК лучше спаривается с гомологичной денатурированной ДНК, чем с гетерологичной (D. Giacomoni и S. Spiegelman, 1962; S. Spiegelman, 1964). Поскольку тРНК участвует в транспорте аминокислот к рибосомам, то она также называется *транспортной РНК*.

Обнаружено, что для образования комплекса аминокислота — транспортная РНК каждая из 20 кислот должна быть активирована перед тем, как она прикрепится к специфической транспортной РНК. Активация заключается в соединении карбоксильной группы аминокислоты с 2'- или 3'-гидроксильной группой аденозинтрифосфата (АТФ), что сопровождается отщеплением двух фосфатных остатков в виде пирофосфата. Эта реакция может быть суммирована следующим образом: аминокислота + АТФ \rightleftharpoons аминоациладенилат + пирофосфат. Реакция прикрепления может быть суммирована так: тРНК + аминоациладенилат \rightleftharpoons аминоацил-тРНК + адевиловая кислота. Один фермент может участвовать как в активации аминокислоты, так и в ее прикреплении к растворимой РНК. По-видимому, для каждой аминокислоты существует свой фермент (A. Norgis и P. Berg, 1964).

Каждая аминокислота, которая должна включиться в полипептид, уже прикреплена к специфической тРНК, когда она подходит к рибосоме. Поскольку, по-видимому, не все основания тРНК спарены друг с другом, то мы можем предположить, что три (или более) неспаренных основания в тРНК (те, что образуют изгиб «шпильки») соединяются водородными связями с комплементарными основаниями информационной РНК. Поэтому транспортная РНК функционирует и как адаптер, *адаптерная РНК*, причем конец, который несет транспортируемую аминокислоту и имеет последовательность «аминокислота А—Ц», остается достаточно гибким для того, чтобы достигнуть нужной области и образовать пептидную связь. Около 2% пуриновых и пиримидиновых оснований в тРНК метилированы. Метильные группы образуются из метионина (см. рис. 32—4, стр. 425), который, теряя метильную группу, переходит в гомоцистеин. Метилируются те основания, которые уже являются частью полирибонуклеотидной цепи тРНК. Несколько разных ферментов, называемых РНК-метилазами, участвуют в синтезе 1-метилгуанина, тимина, 5-метилцитозина, 2-метиладенина, 6-метиламинопурина и 6-диметиламинопурина. РНК-метилаза найдена в ядрышке; она оказалась различной у разных видов. Предполагалось, что метилированные основания занимают особые места в тРНК и играют какую-то роль в ее функционировании. В этой связи следует отметить, что метилированная РНК более устойчива к действию рибо-экзонуклеазы, зависящей от калия, чем неметилированная тРНК. Некоторые основания рибосомной РНК метилированы. Следует напомнить, что 5-метилцитозин присутствует в ДНК только у растений и животных, а 6-метиладенин — только у бактерий. ДНК также может быть метилирована на уровне полidezоксирибонуклеотида, причем разные ферменты используются при образовании 5-метилцитозина (из Ц) и 6-метиламинопурина (из А) ¹.

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ

По-видимому, 70s-рибосома является наименьшей частицей, способной обеспечивать синтез полипептидов. Установлено, что информационная РНК связывается с 30s-субъединицей. С рибосомой могут связываться инфор-

¹ См. статьи Борека; М. Голда и Дж. Гурвитца; У. Литтауэра, К. Менца, П. Берга, В. Джилберта и П. Ф. Спара в сборнике «Cold Spring Harb. Sympos. Quant. Biol.», 1963, 28, 139. 18.

² Новые данные о механизме синтеза белка и работе рибосомы можно найти в обзоре Л. П. Гавриловой и А. С. Спирина (Усп. совр. биол., 1967, 64, вып. 2 (5). — Прим. перев.).

мацион
информ
так как
ную РН
ботать
мой. Сл
а не к
Пока
Р. Шви
нения о
полипеп
нокисло
центрад
Когда б
молекул
живает
лой тРН
функцио
одну по
ционной
Как
ся с раз
предполо
ной РН
ваниях.
которое
будут од
зом. 50s-с
пептида,
1) сле
та — тРН

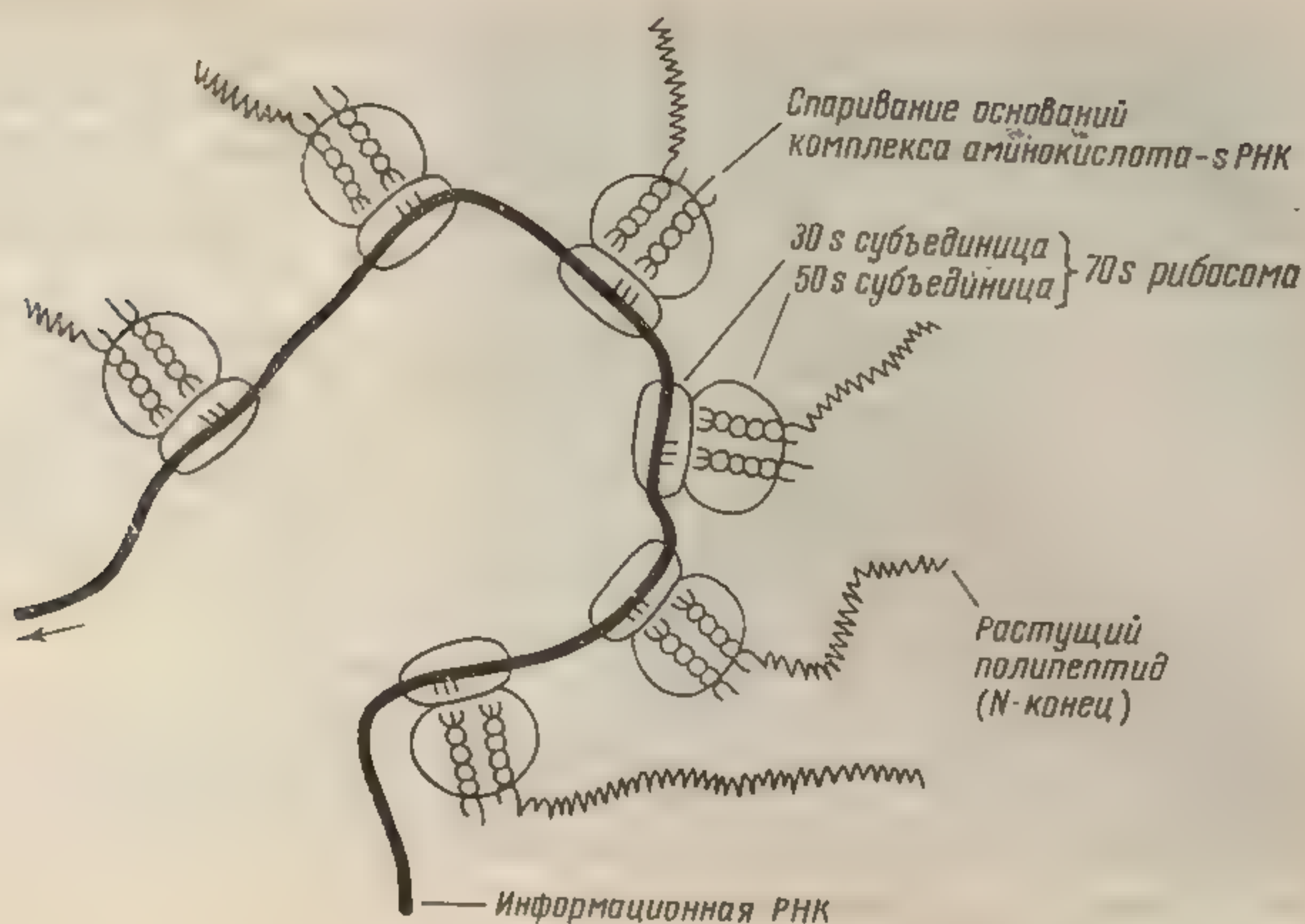


РИС. 33-3.

Гипотетическая схема взаимодействия между информационной РНК, адаптерной РНК, рибосомами и растущими полипептидными цепями

мационные РНК различных размеров. Однако, вероятно, только часть информационной РНК оказывается связанной в каждый данный момент, так как небольшие количества рибонуклеазы расщепляют информационную РНК, но не рибосомы. Если рибосомы, синтезирующие белок, обработать РНКазой, то синтезированный белок остается связанным с рибосомой. Следовательно, новообразованный белок прикреплен к рибосоме, а не к информационной РНК.

Показано, что образование полипептидной цепи (работы Г. Динтица, Р. Швита и сотрудников) протекает путем последовательного присоединения отдельных аминокислот, начиная с N-конца. Поэтому растущая полипептидная цепь должна оканчиваться карбоксильной концевой аминокислотой, несущей молекулу тРНК. Каждая рибосома имеет только два центра для прикрепления тРНК, и они оба находятся на 50s-субъединице. Когда белок не образуется, то только один центр может удерживать молекулу тРНК. Однако во время образования белка второй центр удерживает растущую полипептидную цепь, которая заканчивается молекулой тРНК (J. Warner and A. Rich, 1964) (рис. 33—3). Следовательно, каждая функционирующая рибосома в каждый данный момент образует только одну полипептидную цепь и получает только одну молекулу информационной РНК.

Как работает рибосома? Очевидно, что транспортные РНК спариваются с разными частями нити информационной РНК; поэтому необходимо предположить, что в определенный момент каждый участок информационной РНК передает информацию, заключенную в его неспаренных основаниях. Очевидно, 30s-субъединица обеспечивает адаптерное свойство, которое гарантирует, что последующие сегменты информационной РНК будут одностратными, а их основания будут ориентированы нужным образом. 50s-субъединица удерживает только что образовавшуюся часть полипептида, которая заканчивается молекулой тРНК таким образом, что:

1) следующая соответствующая комбинация свободная аминокислота—тРНК, вероятно, может спариваться с помощью нуклеотидов, находя-

щихся в области изгиба молекулы sРНК, со следующей последовательностью информационной РНК;

2) фермент может связывать NH_2 -конец свободного комплекса аминокислота — тРНК с карбоксильным концом комплекса аминокислота — sРНК, находящегося у конца полипептидной цепи, в результате чего освобождается молекула тРНК, ранее связанная с концом полипептидной цепи;

3) освобожденная тРНК затем может акцептировать и транспортировать другую соответствующую специфическую аминокислоту.

Неизвестно, как освобождается тРНК с конца законченного полипептида. Следует также отметить, что поскольку образующаяся полипептидная цепь, по-видимому, прикреплена к 50s-частице только у растущего конца (это прикрепление требует присутствия гуанозинтрифосфата), то окончательная трехмерная конфигурация полипептида в основном может сформироваться еще до того, как закончится его синтез.

Так как местом образования пептидной связи служит только один специфический рибосомный центр, то информационная РНК не может оставаться в одном положении на рибосоме. Следовательно, матрица информационной РНК должна двигаться по поверхности рибосомы или через нее. Диаметр 70s-рибосомы составляет всего лишь 230 Å. Были найдены информационные РНК, содержащие более 1500 нуклеотидов; если среднее межнуклеотидное расстояние принять за 3,4 Å, то длина этой РНК превысит 5000 Å. Эти данные заставляют предполагать, что одна и та же информационная РНК может быть использована несколькими рибосомами одновременно, а полипептид, который каждая из них образует, будет находиться в данный момент на разных стадиях роста (рис. 33—3). Эта гипотеза подкрепляется данными о том, что в некоторых системах синтез белка осуществляется агрегатами из 5—8 70s (или 80s)-рибосом. Такие синтезирующие белок рибосомные агрегаты — *полирибосомы*, или *полисомы* (*эргосомы*) можно увидеть на электронных микрофотографиях. Когда работают длинные информационные РНК, полисомы могут содержать очень много рибосом. Рибосомы, которые закончили синтез полипептида, освобождаются, чтобы начать процесс снова; каждая рибосома употребляется для синтеза белка несколько раз. Так как рибосомы найдены в ядре, то не удивительно, что (как показали А. Е. Мирский, В. Г. Олфри и другие) и там имеет место синтез белка. Данные, полученные в опытах *in vitro*, заставляют предполагать наличие промежуточной стадии в синтезе белка, когда ДНК с помощью мРНК связана с функционирующими рибосомами. Установление такой промежуточной стадии *in vivo* имело бы большое значение для понимания того, как осуществляется стабилизация мРНК, полярное прикрепление мРНК к рибосомам, а также регуляция синтеза белка (R. Vigne и др., 1964).

Если к среде, в которой выращиваются бактерии, добавить аналог (5-фторурацил), то синтез всех бактериальных белков останавливается через несколько минут. Так как этот аналог быстро включается в синтезирующуюся РНК, то можно ожидать, что он войдет в состав новой информационной РНК; а это приведет к неправильному присоединению адаптерных РНК и, следовательно, к образованию дефектных белков. Это наблюдение позволяет предполагать, что у бактерии новая информационная РНК образуется постоянно, а старая информационная РНК существует недолго. Как отмечалось ранее, синтез новой информационной РНК на ДНК блокируется при добавлении антибиотика *актиномицина Д*. Исследования, проведенные на бактериях, обработанных актиномицином Д, показывают, что половина информационной РНК распадается приблизительно за 2 мин., и она используется как матрица только 10—20 раз¹.

¹ У бактерий также обнаружены стабильные типы информационной РНК, время жизни которых сравнимо с периодом генерации бактериальной клетки. — Прим. перев.



СОЛ СПИГЕЛМАН
(1964 г.)

У других организмов некоторые информационные РНК (например, мРНК для гемоглобина) существуют более длительное время. Механизм, с помощью которого информационная РНК распадается, пока еще не известен. Возможно, что здесь принимает участие рибонуклеаза, так как в бактериальных клетках значительные количества РНКазы (если не вся РНК-аза) обнаруживаются в латентной форме в связи с 30s-частицами (М. Tal a. D. Elson, 1961; I. Raake a. J. Fiala, 1964). Более того, нет никаких данных о существовании на рибосоме латентной структурной РНКазы в тех случаях, когда информационная РНК, по-видимому, не распадается, как это имеет место в ретикулоцитах, где она медленно обменивается. С другой стороны, согласно данным М. Секигуши и С. С. Коэна, (1963) а также В. Ц. Хаймер и И. Л. Кафф (1964), у микроорганизмов информационную РНК разрушает *полинуклеотидфосфорилаза*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как правило, РНК синтезируется в хромосомах; многие (но не все) полипептиды образуются в цитоплазме. РНК-полимераза, зависящая от ДНК, передает информацию, заключенную в одной из цепей двунитчатой ДНК, молекуле одновитчатой информационной РНК, которая комплементарна этой нити ДНК. По-видимому, один конец этой РНК присоединяется к рибосоме. С помощью рибосомы группы оснований информационной РНК, следующие одна за другой, ориентируются в каждый данный момент таким образом, что они могут спариваться с неспаренными внутри адаптерной РНК комплементарными основаниями. Каждый тип адаптерной РНК переносит только одну определенную аминокислоту. Так как рибосома, синтезирующая белок, присоединяет каждый раз только одну молекулу адаптерной РНК, несущей аминокислоту, то полипептидная цепь растет в результате ступенчатого присоединения по одной аминокислоте (начиная с N-конца). По мере того как информационная РНК транслируется, она продвигается по поверхности рибосомы (или через нее), ее начальный участок освобождается и соединяется с другой рибосомой. Следовательно, несколько рибосом, составляющие полисому, одновременно транслируют одну информационную РНК.

Рибосомы могут быть использованы много раз; данная информационная РНК может быть использована 10—20 раз (в некоторых случаях — значительно больше); адаптерная РНК, освобожденная из растущей полипептидной цепи, снова присоединяет и транспортирует молекулу аминокислоты.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

33.1. Какие выводы Вы можете сделать, исходя из того, что в разных условиях скорость синтеза белка пропорциональна концентрации рибосом?

33.2. Что может произойти с 80s-рибосомой, которая только что закончила синтез полипептида?

33.3. Обсудите гипотезу, согласно которой рибосомы являются вирусами.

33.4. В молекуле гемоглобина ретикулоцитов содержится 17 молекул лейцина. Как Вы объясните данные Дж. Р. Уорнера, показывающие, что в полисоме, синтезирующей гемоглобин, на рибосому приходится в среднем 7,4 молекулы лейцина?

33.5. Чем объясняется разница между полисомами, состоящими из пяти или шести рибосом (в ретикулоцитах, синтезирующих гемоглобин), и полисомами из 50—70 рибосом (в животных клетках, зараженных вирусом полиомиелита)?

33.6. Как могли бы измениться свойства РНК после метилирования?

33.7. По-видимому, димер мутантного гемоглобина (Hb — Лепоре), не содержащий α -цепей, состоит из N-терминального участка δ -цепи, соединенного с C-терминальным участком β -цепи. Эта «гибридная» δ — β -цепь имеет ту же длину, что и δ -цепь или β -цепь. Вспомните, что гены для цепей δ и β тесно сцеплены и что ген δ вероятно образовался в результате дупликации гена β . Обсудите применимость следующих генетических объяснений происхождения Hb — Лепоре:

а) существование делеции, захватывающей части генов β и δ , а также области, разделяющей их;

б) неправильная конъюгация генов β и δ , благодаря чему после кроссинговера образуется один кроссовер с последовательностью генов β , β — δ , δ (фенотипический эффект не известен) и комплементарный кроссовер δ — β .

Сопоставьте Ваше мнение об этих вариантах генетической интерпретации с соображениями К. Бальони (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1962, v. 48, 1880—1886).

33.8. Предложите механизм, с помощью которого в составе зрелого фага ϕ X174 оказывается только одна вить ДНК, тогда как его репликативная форма содержит обе нити ДНК.

33.9. Сравните терминальные нуклеотиды ВТМ и тРНК. Какое заключение Вы можете сделать из этого сравнения?

33.10. Какие выводы Вы можете сделать из того факта, что, несмотря на идентичность состава рибосомных РНК *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus megaterium*, ДНК первой содержит 64% Г + Ц, а ДНК последней — 44% Г + Ц?

33.11. Хотя в среднем клетка печени взрослой крысы, по-видимому, делится реже чем один раз в год, количество белка, которое она синтезирует примерно каждые 6 дней, равно количеству белка, которое она содержит. У бактерии же время, необходимое для удвоения содержания белка, примерно равно времени генерации. Сопоставьте обмен информационной РНК у бактерий с ее обменом в клетках печени взрослых крыс.

33.12. Если нативную РНКазу обрабатывают мочевиной или сульфгидрильными реагентами, то ее дисульфидные мостики разрушаются, и фермент разворачивается, принимая неактивную линейную конфигу-

рацию.
медленн
и восста
результ
чески?

ЛИТЕ

V. G. All

(В. Олф

клетка».

E. K. F. B

Colum

Y. Becker

Proc.

S. Brenner

from C

D. D. Bro

Mutan

R. Byrne,

a DNA

M. Chandl

Replica

M. I. H. C

Proc. M

F. H. C. C

F. H. C. C

J. N. David

J. J. Furth,

Biochem

H. Gay. Nuc

E. P. Geidus

tary RN

E. P. Geidus

plement

D. Giacom

Dictiona

M. H. Green

Sci. U.

F. Gross, H.

Unstable

B. D. Hall

RNA.—

M. Hayashi,

tion to C

1963, 50

M. Hayashi,

Strand S

U. S., 19

M. B. Hoagla

J. Hurwitz

Acid Res

J. Hurwitz

W. C. Hymer

and its

Commun.

C. G. Kurlan

Ribosomes

J. S. Krakow

I. Priming

P. S. Leboy,

Protein in

рацию. Если затем через раствор такого денатурированного фермента медленно пропускают O_2 , то снова образуются дисульфидные мостики и восстанавливается ферментативная активность. Свидетельствуют ли эти результаты о том, что сворачивание полипептидов определяется генетически?

ЛИТЕРАТУРА

- V. G. Allfrey and A. E. Mirsky. How Cells Make Molecules.—*Scient. Amer.*, 1961, N 205, 74.
(В. Олфри и А. Мирский. Как клетки создают молекулы.— В кн. «Живая клетка». М., ИЛ, 1962).
- E. K. F. Bautz and B. D. Hall. The Isolation of T4-Specific RNA on a DNA-Cellulose Column.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, 400.
- Y. Becker and W. K. Joklik. Messenger RNS in Cells Infected with Vaccinia Virus.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, 477.
- S. Brenner, F. Jacob and M. Meselson. An Unstable Intermediate Carrying Information from Genes to Ribosomes for Protein Synthesis.—*Nature*, 1961, 190, 576.
- D. D. Brown and J. B. Gurdon. Absence of Ribosomal DNA synthesis in the Anucleolate Mutant of *Xenopus laevis*.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, 139.
- R. Byrne, J. G. Levin, H. A. Bladen and M. W. Nirenberg. The in vitro Formation of a DNA — Ribosome Complex.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 140.
- M. Chandler, M. Hayashi, M. M. Hayashi and S. Spiegelman. Circularity of the Replicating Form of a Single-Stranded DNA Virus.—*Science*, 1964, 143, 47.
- M. I. H. Chinchase and M. L. Birnstiel. Synthesis of Transfer RNA by Isolated Nuclei.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 49, 692.
- F. H. C. Crick. Nucleic Acids.—*Scient. Amer.*, 1957, N 197, 1884.
- F. H. C. Crick. On Protein Synthesis.—*Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1958, 12, 138.
- J. N. Davidson and W. E. Cohn. (Eds.) *Progr. Nucleic Acid Res. N. Y.*, 1963, v. 2.
- J. J. Furth, J. Hurwitz and M. Goldman. The Directing Role of DNA in RNA Synthesis.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1961, 4, 362.
- H. Gay. Nuclear Control of the Cell.—*Scient. Amer.*, 1960, N 202, 126.
- E. P. Geiduschek, J. W. Moohr and S. B. Weiss. The Secondary Structure of Complementary RNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, 1078.
- E. P. Geiduschek, T. Nakamoto and S. B. Weiss. The Enzymatic Synthesis of RNA, Complementary Interaction with DNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1961, 47, 1405.
- D. Giacomoni and S. Spiegelman. Origin and Biologic Individuality of the Genetic Dictionary.—*Science*, 1962, 138, 1328.
- M. H. Green. Strand Selective Transcription of T4 DNA in vitro.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 138.
- F. Gross, H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risebrough and J. D. Watson. Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling.—*Nature*, 1961, 190, 581.
- B. D. Hall and S. Spiegelman. Sequence Complementarity of T2-DNA and T2-Specific RNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1961, 47, 137.
- M. Hayashi, M. N. Hayashi and S. Spiegelman. Restriction of in vivo Genetic Transcription to One of the Complementary Strands of DNA.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 664.
- M. Hayashi, M. N. Hayashi and S. Spiegelman. DNA Circularity and the Mechanism of Strand Selection in the Generation of Genetic Messages.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 51, 351.
- M. B. Hoagland. Nucleic Acids and Proteins.—*Scient. Amer.*, 1959, N 201, 55.
- J. Hurwitz and J. T. August. The Role of RNA in RNA Synthesis.—*Progr-Nucleic Acid Res.*, 1963, V. 1, p. 59.
- J. Hurwitz and J. J. Furth. Messenger RNA.—*Scient. Amer.*, 1962, N 206, 41.
- W. C. Hymer and E. L. Kuff. Enzymatic Breakdown of Rapidly Labeled Nuclear RNA and its Inhibition by Cytoplasmic Soluble Fraction.—*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 15, 506.
- C. G. Kurland. Molecular Characterization of Ribonucleic Acid from *Escherichia coli* Ribosomes.—*J. Mol. Biol.*, 1960, 2, 83.
- J. S. Krakow and S. Ochoa. Ribonucleic Acid Polymerase of *Azotobacter vinelandii*. I. Priming by Polyribonucleotides.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 49, 88.
- P. S. Leboy, E. C. Cox and J. G. Flax. The Chromosomal Site Specifying an Ribosomal Protein in *Escherichia coli*.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 1367.

- Липман Ф. Информационная рибонуклеиновая кислота. В сб.: Нуклеиновые кислоты, изд-во «Мир». М., 1965, стр. 155.
- E. H. McConkey and J. W. Hopkins. The Relationship of the Nucleolus to the Synthesis of Ribosomal RNA in HeLa Cells.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 1197.
1. T. Norris and P. Berg. Mechanism of Aminoacyl RNA Synthesis: Studies with Isolated Aminoacyl Adenylate Complexes of Isoleucyl RNA Synthetase.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 330.
- I. D. Raacke and J. Fiala. Polyribosome-Bound Nucleoside Triphosphatases in *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 323.
- E. Reich. Actinomycin: Correlation of Structure and Function of Its Complexes with Purines and DNA.—Science, 1964, 143, 684.
- A. Rich. Polyribosomes.—Scient. Amer., 1963, N 209, 44. (А. Рич. Полирибосомы.— Сб. «Структура и функции клетки». М., из-во «Мир», 1964).
- H. M. Schulman and D. M. Bonner. A Naturally Occurring DNA-RNA Complex from *Neurospora crassa*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 53.
- R. M. S. Smellie. The Biosynthesis of Ribonucleic Acid in Animal Systems.— Progr. Nucleic Acid Res., 1963, v. 1, p. 27.
- S. Spiegelman. Hybrid Nucleic Acids.— Scient. Amer., 1964, 210, 48. (С. Спигелман. Гибридные нуклеиновые кислоты.— В кн. «Молекулы и клетки». М., изд-во «Мир», 1966).
- A. S. Spirin. Macromolecular Structure of Ribonucleic Acids, N. Y. 1964.
- A. Stevens. Net Formation of Polyribonucleotides with Base Compositions Analogous to Deoxyribonucleic Acid.—J. Biol. Chem., 1961, 236, PC 44.
- Synthesis and Structure of Macromolecules.—Cold Spring Harb. Sympos. Quant. Biol., 1964, 28.
- M. Tal and D. Elson. The Reversible Release of Protein, Ribonucleic Acid and Deoxyribonuclease from Ribosomes.— Biochim. et biophys. acta, 1961, 53, 227.
- J. R. Warner and A. Rich. The Number of Soluble RNA Molecules on Reticulocyte Polyribosomes.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 1134.
- S. A. Yankofsky and S. Spiegelman. Different Cistrons for the Two Ribosomal RNA Components.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 538.
- P. C. Zamecnik. The Microsome.—Scient. Amer., 1958, N 198, 118.
- P. C. Zamecnik. Historical and Current Aspects of the Problem of Protein Synthesis. — Harvey Lect., 1960, 54, 254.
- G. Zubay. Molecular Model for Protein Synthesis.— Science, 1963, 150, 1092.

См. Приложение IX и последнюю часть Приложения IV. Список ссылок можно найти в конце Нобелевских лекций Вилкинса и Уотсона.

Если
лоту,
амино
кодиро
предпо
нукле
венны
лений,
ние о
выполн
леннос
не хват
предпо
более ч
(Остает
трех р
летный
мые в
20 амин
триплет
позволя
нуклеот
На п
мацион
дующие
здесь не
указыва
вательн
рибонук
определи
ошибки
345. Зат
леть, тол
считыват
РНК. В
ния кода

ОБЛАСТЬ

Тонкая п
в главе 2
нов), А и
функцион
ве, можн
которая с
создания
выделить

29 И. Гершк

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОДИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ

Если бы каждый рибонуклеотид транслировался только в одну аминокислоту, то можно было бы определить, или закодировать только четыре аминокислоты. Но так как имеется 20 аминокислот, то возникает *проблема кодирования аминокислот с помощью РНК*. Чтобы решить эту проблему, предположим, что аминокислота кодируется последовательностью из двух нуклеотидов: имеется как бы алфавит из четырех букв и язык из двух буквенных слов. Предполагая, что код может читаться только в одном направлении, мы получим 16 (4×4) возможных дублетов (слов). (Предположение о том, что считывание идет в одном направлении, представляется вполне разумным, так как каждая нить РНК имеет определенную направленность, как и отдельная нить ДНК.) Однако, ввиду того, что 16 дублетов не хватает для кодирования 20 аминокислот, надо сделать какие-то другие предположения. Мы могли бы предположить, что данный дублет кодирует более чем одну аминокислоту, и в этом случае код был бы *двусмысленным*. Остается признать, что аминокислота кодируется последовательностью трех рибонуклеотидов информационной РНК — триплетом. Такой триплетный код дал бы нам 64 ($4 \times 4 \times 4$) разных последовательности, читаемые в одном направлении. Этого более чем достаточно для кодирования 20 аминокислот. Если бы одна аминокислота кодировалась более чем одним триплетом, то код был бы *вырожденным*. Это предварительное обсуждение позволяет предполагать, что последовательность из двух или трех рибонуклеотидов кодирует аминокислоту, т. е. действует как *кодон*.

На кодирование аминокислот могут влиять и другие свойства информационной РНК. Так как в информационной РНК могут находиться следующие один за другим сотни или тысячи нуклеотидов; то, следовательно, здесь нет никаких промежутков (т. е. ненуклеотидных знаков препинания), указывающих, где кончается один кодон и начинается следующий. Следовательно, мы имеем дело с *кодом без запятых*. Предположите, что шесть рибонуклеотидов расположены линейно — 123456. Если триплет 123 определяет аминокислоту А, а триплет 456 аминокислоту Б, то возможны ошибки в результате образования перекрывающихся триплетов 234 или 345. Затруднения, связанные с перекрыванием кодонов, можно преодолеть, только если следующие друг за другом дублеты или триплеты будут считываться, начиная с одной определенной точки на информационной РНК. В этом случае функцию запятых выполняет сам механизм считывания кода.

ОБЛАСТЬ r II И КОД

Тонкая генетическая структура области r II фага Т4 уже обсуждалась в главе 26. Напомним, что область r II состоит из двух генов (или цистронов), А и В. Чтобы получился фенотип r^+ , оба они должны правильно функционировать. На основании данных, приведенных в предыдущей главе, можно сделать вывод, что эти гены образуют информационную РНК, которая определяет две разные полипептидные цепи, необходимые для создания фенотипа r^+ . В случае гемоглобина белковый продукт гена легко выделить и анализировать, но генетическую природу изменений глобина

изучать трудно; обратная картина имеется в случае r^+ -фенотипа. Другими словами, несмотря на то, что предполагаемые полипептидные цепи, участвующие в образовании фенотипа r^+ , не были обнаружены, можно легко расшифровать генетическую природу мутантов r II. Конечно, мы предпочли бы изучать систему, где можно легко исследовать и генетические характеристики, и свойства соответствующих полипептидов; тем не менее, генетические исследования области r II (F. Crick и др., 1961) дают нам дополнительные сведения о действии гена и кодирования с помощью РНК.

Карта гена A состоит из шести основных участков (от A_1 до A_6), а гена B — из десяти (от B_1 до B_{10}), причем все цифровые обозначения идут слева направо. Поскольку эти гены комплементируют, то точечные мутации ни в одном из сегментов гена A не влияют на функцию гена B , и наоборот. Можно индуцировать многочисленные точечные мутации в областях B_1 и B_2 с помощью химических мутагенов, вызывающих замещения оснований по типу транзиций или трансверсий. У части таких мутантов утеряна вся активность цистрона B , у других обнаруживается некоторая активность этого цистрона. Как и следовало ожидать, те мутанты, которые образовались в результате замещения основания, могут ревертировать с восстановлением активности цистрона B после обработки химическими мутагенами, вызывающими обратные трансверсии и транзиции. С другой стороны, мутанты B_1 и B_2 , полученные с помощью акридинов, всегда целиком инактивируют функцию гена B и не ревертируют после обработки мутагенами, вызывающими замещения оснований. Такой результат можно ожидать, если акридины действуют действительно как мутагены, вызывая добавление или потерю одного или более нуклеотидов (см. стр. 407).

Получено большое количество мутантов, индуцированных акридином и локализованных в сегментах B_1 и B_2 . Они характеризуются инактивацией цистрона B . Рекомбинация между такими мутантами дает потомство фагов, несущих от двух до шести разных точечных мутаций, индуцированных акридином. Некоторые из двойных мутантов не обладают B -активностью, в то время как у других она восстанавливается. Если получить достаточно полные серии из разных комбинаций двойных мутантов, то можно наблюдать определенную закономерность. Пытаясь интерпретировать эту закономерность, предположим, что каждый данный мутант либо дополнительно получил один или несколько нуклеотидов («+»), либо потерял их («-»). Предположим также, что кодон содержит более двух нуклеотидов и что код неперекрывающийся; другими словами, происходит последовательное считывание кодонов. Можно выделить мутант «-», который супрессирует мутант «+», и наоборот. Выделяя группы «супрессоров» и группы «супрессоров супрессоров», можно получить таким образом серии мутантов типа «+» и «-». Неизвестно, какие из двух мутаций («+» или «-») несут добавочные нуклеотиды. Ни один из двойных мутантов (ни «--», ни «++») не приводит к восстановлению активности B , так как считывание кодонов сбивается на первом мутанте и продолжает сбиваться и за пределами второго мутанта. Если мутантные локусы далеко отстоят друг от друга, то комбинация из двух мутантов (+— или —+) не приводит к восстановлению активности гена B , поскольку все кодоны, находящиеся между мутантами, считываются неправильно — сбивается периодичность считывания (внефазное считывание), хотя кодоны перед первым мутантом и после второго мутанта считываются правильно в «нужной фазе». Однако, если мутантная комбинация (+— или —+) захватывает близлежащие нуклеотиды, то возможно, что неправильно считываться будет только один или несколько кодонов — те, что находятся между мутантами. Каждый данный мутант может быть отнесен к типу «+» или «-», и только комбинация из двух мутантов (+— или —+) частично восстанавливает активность B , если два мутанта в сегментах B_1 — B_2 лежат близко друг к другу. Эти предположения можно проверить другим спо-

собом. Если B все еще (все + ил. утраченны в кодоне. I ним мута фазе» — и

Соответ четыре, пя мутантов, ностью B ; четыре «+» не обнаруж результаты следующих вероятнее всего суется пре состоит вер Очевидно, ч тарный трип транслирует кулой тРНК но, предпола в тРНК идее цилом.

В фаге ди годаря чему о го гена, либ участок межд часть области частицы лише зависимости о соответствующ обозначающий конец B и нач этот мутант м мационной РН генов A и B , к проверить след сти A , индуци в фаги, несущи вируется. Дру тате мутаций в но которой деле двумя генами, в гене A считы ны, включая и к таты позволяют r II всегда счита в котором гены на рис. 26—4) данные. Наприм цией в области A активность цист «+» и «-». Оказы могут восстано эффективны. Кро

собою. Если в присутствии нескольких неправильных кодонов активность *B* все еще частично сохраняется, то число мутационных ошибок такого типа (все + или все —) можно было бы увеличивать до тех пор, пока число утраченных или добавленных нуклеотидов не станет равным их числу в кодоне. Как только была бы достигнута эта точка, нуклеотиды за последним мутантным кодоном стали бы считываться правильно — «в нужной фазе» — и активность *B* могла бы частично восстановиться.

Соответственно этим требованиям были получены фаги, несущие три, четыре, пять и даже шесть разных мутаций (— или +). Некоторые из мутантов, несущих три или шесть «—» или «+» мутаций, обладают активностью *B*; другие комбинации (например, четыре «—» и один «+», или четыре «+» и один «—») также обнаруживают активность *B*. Активность не обнаруживается, если число мутаций не равно или не кратно трем. Эти результаты показывают, что информация с гена *B* транслируется с помощью следующих друг за другом, неперекрывающихся кодонов и что кодоны вероятнее всего состоят из трех нуклеотидов. С этим положением согласуется предполагаемая молекулярная модель тРНК, и гиб которой состоит вероятно из трех неспаренных нуклеотидов (см. рис. 33—2). Очевидно, что триплетный кодон ДНК транскрибируется в комплементарный триплетный кодон информационной РНК, который, в свою очередь, транслируется в аминокислоту, помещаемую в нужное положение молекулой тРНК, несущей комплементарный кодон — триплет. Следовательно, предполагается, что триплетный кодон в ДНК и единственный триплет в тРНК идентичны, за исключением того, что в РНК тимин заменен урацилом.

В фаге дикого типа r^+ гены *A* и *B* каким-то образом разделены, благодаря чему образуются либо отдельные информационные РНК для каждого гена, либо единая информационная РНК, содержащая незначительный участок между частями *A* и *B*. Одна из делеций, 1589, удаляет большую часть области *A*, и целиком удаляет области *A*₆, *B*₁ и *B*₂. Такие фаговые частицы лишены активности *A* и частично обладают активностью *B*. Вне зависимости от того, образуют ли фаги r^+ отдельные информационные РНК, соответствующие генам *A* и *B*, можно предположить, что промежуток, обозначающий конец РНК гена *A* и начало РНК гена *B* (или наоборот, конец *B* и начало *A*), отсутствует у фагов с делецией 1589. Следовательно, этот мутант может образовывать только одну непрерывную ленту информационной РНК, содержащую основания, комплементарные тем частям генов *A* и *B*, которые еще присутствуют в геноме. Эту возможность можно проверить следующим образом. Отдельные «+» (или «—») мутации области *A*, индуцированные акридином, вводятся с помощью рекомбинаций в фаги, несущие делецию 1589. Во всех этих случаях ген *B* также инактивируется. Другими словами, ген *B* теперь также повреждается в результате мутаций в гене *A*. Эти данные подтверждают ту точку зрения, согласно которой делеция 1589 обуславливает образование информационной РНК двумя генами, и если в результате выпадения или добавления нуклеотидов в гене *A* считывание оказывается «внефазным», то все последующие кодоны, включая и кодоны гена *B*, будут считываться неправильно. Эти результаты позволяют также считать, что кодоны информационной РНК области r^+ II всегда считываются в направлении от *A* к *B*, т. е. в том же порядке, в котором гены обычно располагают на генетических картах (так же, как на рис. 26—4). В пользу такой интерпретации говорят и другие данные. Например, когда делеция 1589 имеется у фага с двойной мутацией в области *A*, ген *B* в некоторых случаях инактивируется, но иногда активность цистрона *B* частично сохраняется. Обозначим мутанты как «+» и «—». Оказывается, что в гене *A* только двойные мутации типа «+—» могут восстановить активность гена *B*; сочетания «—» или «++» не могут. Кроме того, как и следовало ожидать, здесь не играет роли

расстояние между двумя мутациями, а также последовательность мутаций (+— или —+).

Поскольку делеция 1589 частично сохраняет активность гена *B*, то она должна представлять собой делецию числа нуклеотидов, кратного трем. Хотя кодон не может содержать менее чем три нуклеотида, он может состоять из числа нуклеотидов, кратного трем, если, например, каждая мутация + (или —) приводит к добавлению (или к потере) двух нуклеотидов. В этом случае кодон будет состоять из шести нуклеотидов. Мы можем определить размер кодона, соединяя мутант 1589 с разными делециями среднего размера в гене *A*. Предполагая, что обе точки разрывов, приводящие к таким делециям, встречаются беспорядочно, можно было бы заключить, что одна треть делеций *A* точно удаляла бы число нуклеотидов, кратное трем, одна шестая — кратное шести и так далее. Следовательно, если бы кодон состоял из шести нуклеотидов, то одна шестая делеций давала бы возможность функционировать гену *B*; если бы кодон состоял из трех нуклеотидов, то к такому результату приводила бы одна треть делеций. Опыты показывают, что в гене *A* в действительности немногим более одной трети этих делеций среднего размера приводит к восстановлению у мутантов активности гена *B*.

Как можно себе представить природу участка, который в норме разделяет гены *A* и *B* у фага дикого типа *r*⁺? Если последовательность нуклеотидов ДНК у концов каждого гена, *A* и *B*, заменяется на короткую последовательность аминокислот (см. стр. 289), то транскрипция будет прерываться физически, благодаря чему появятся точки, указывающие на начало и конец образования информационной РНК и полипептидов. Имеется и другая возможность; последовательность нуклеотидов информационной РНК, комплементарная последовательности трех (более или) нуклеотидов ДНК между генами *A* и *B*, не находит предполагаемого комплементарного триплета ни в одной из тРНК. Этот нетранслируемый кодон тРНК не может определять ни одну из аминокислот и поэтому называется *бессмысленным кодоном*. Согласно этой гипотезе, гены *A* и *B* в норме образуют непрерывную ленту информационной РНК, которая при трансляции дает два отдельных полипептида.

Сколько кодонов (из 64) относятся к бессмысленным? Генетические исследования области *r* II убедительно говорят в пользу того, что таких триплетов сравнительно мало¹. Следовательно, большинство триплетов, вероятно, кодируют аминокислоты, а поскольку обычно встречается только 20 аминокислот, то одна аминокислота может кодироваться более чем одним кодоном. Таким образом, *in vivo*, очевидно, существует вырожденный триплетный код. Если спаривание оснований тРНК с информационной РНК протекает очень точно, т. е. строго комплементарно, то должно существовать более 20 видов тРНК, причем несколько типов тРНК будут переносить одну и ту же аминокислоту. С другой стороны, если существует только 20 типов тРНК, и спаривание оснований с триплетами информационной РНК оказывается не очень точным, то данная молекула тРНК будет спариваться с разными (но сходными) триплетами информационной РНК. Можно принять любой из этих механизмов вырожденности. В результате его приложения большая часть мутаций, заключающихся в замене оснований, вероятно, приводит к осмысленным кодоном, которые кодируют другую аминокислоту, и, следовательно, образуются *кодона с иным значением* (missence codons).

Удалось определить нуклеотидную природу некоторых точечных мутантов в области *r* II (С. Чэмп и С. Бензер, 1962). Предположим, что в нити ДНК, используемой для образования *r*⁺-информационной РНК, Г заме-

¹ Установлено, что имеется три бессмысленных триплета — УАА, УАГ и УГА (Brenner S., Barnett и др. — Nature, 1967, 213, 449). — Прим. перев.

нен на А
мутант *r*⁺
информаци
к образов
ся мутаге
использо
замещает
ошибочно
на стр. 4
с мутант
тРНК, ко
в *r*⁺-проду
аминокисл
ные к лизи
жат Г в то
формацион
к лизису в
ДНК, кото
щью разли
часто можн
пользуется

Иногда
сколько то
цепи. Пред
точечные му
тате одинак
пептидные
Эти состоя
специфичес
аминокислот
что тРНК
несущей му
оказаться то
месте в пол
(неправильн
зовывать бел
ки — тРНК,
ные мутанты
по данным С
(Proc. Nat. A

ИДЕНТИФИКА

Механизм син
разрушенных
добавляя аде
со смесью 20
одна из добав
в белок, ради
лении ДНКаз
РНК, разруша
тез белка пре

¹ В настоящее в
кодонов можно
Изд-во «Мир».

нен на А, в результате чего образуется некий специфический точечный мутант *r*. Этот мутант фага не лизирует штамм K12 *E. coli*, так как его информационная РНК, содержащая У вместо Ц, ненормальна и приводит к образованию дефектных *r*⁺-продуктов. Хотя 5-фторурацил не оказывает мутагенным при добавлении к среде, на которой растет K12, его можно использовать для замещения У в синтезирующейся РНК. Если фторурацил замещает У в информационной РНК, то молекула тРНК иногда может ошибочно принимать его за Ц (см. обсуждение данных по бромурацилу на стр. 412). Если такая ошибка произошла, то тРНК, спарившаяся с мутантной информационной РНК, будет содержать Г и будет той самой тРНК, которая в норме переносит ту аминокислоту, которая находится в *r*⁺-продукте. Следовательно, в *r*⁺-продукт правильно включится нужная аминокислота, и клетка хозяина лизируется. Поэтому *r*-мутанты, способные к лизису только при добавлении фторурацила, вероятнее всего содержат Г в той цепи ДНК фага *r*, которая используется для образования информационной РНК, а Ц — в комплементарной цепи. Мутанты, неспособные к лизису в присутствии фторурацила, могут содержать А или Ц в том месте ДНК, которое участвует в транскрипции информационной РНК. С помощью различных химических мутагенов, как и с помощью фторурацила, часто можно определить, присутствует ли Т, А или Ц в нити, которая используется при транскрипции.

Иногда один бактериальный мутант супрессирует одновременно несколько точечных мутантов, находящихся в других местах нуклеотидной цепи. Предположим, что в некоторых из этих случаев все супрессируемые точечные мутанты содержат один и тот же триплет, измененный в результате одинакового замещения оснований, благодаря чему в разные полипептидные продукты неправильно включается одна и та же аминокислота. Эти состояния могут быть супрессированы мутантом, в котором изменена специфичность фермента, ответственного за активацию и прикрепление аминокислот к тРНК. Такая модификация сможет иногда привести к тому, что тРНК будет неправильно переносить аминокислоту к рибосоме, несущей мутантную информационную РНК; эта аминокислота может оказаться той самой аминокислотой, которая в норме включается в этом месте в полипептид. Следовательно, мутанты, образующие измененную (неправильную) информационную РНК, все же могут безошибочно образовывать белок, если имеется компенсация в виде дополнительной ошибки — тРНК, неправильно переносящей аминокислоту. Такие супрессорные мутанты в известных пределах изменяют аминокислотный код, согласно данным С. Бензера и С. П. Чэмпа, а также А. Гарена и О. Сидики (Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, v. 48, 1114—1127).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОДОНОВ¹

Механизм синтеза белка можно изучать *in vitro*, используя суспензию разрушенных клеток. Такую бесклеточную систему получают из *E. coli*, добавляя аденозин-, гуанозин-, цитидин- и уридин-5'-трифосфаты вместе со смесью 20 L-аминокислот. Синтез белка можно легко обнаружить, если одна из добавляемых аминокислот (например, валин), которая включается в белок, радиоактивна. Включение аминокислот подавляется при добавлении ДНКазы, которая останавливает образование информационной РНК, разрушая ДНК. При отсутствии новой информационной РНК синтез белка прекращается.

¹ В настоящее время код полностью расшифрован. Новые данные об идентификации кодонов можно найти в книге Дж. Уотсона «Молекулярная биология гена» (1967, Изд-во «Мир»). — Прим. перев.

Такое влияние ДНКазы связывают с образованием информационной РНК, поскольку при добавлении к системе тРНК или рибосомной РНК валин не включается, но включение восстанавливается, когда добавляется информационная РНК, полученная из отмытых рибосом. Добавляемая информационная РНК может быть получена и из других источников. Например, экстракты *E. coli* можно использовать для синтеза гемоглобина с помощью РНК из ретикулоцитов кролика, а РНК фага f2 в этой системе стимулирует включение аминокислот в белок, в том числе и в белок оболочки фага (D. Nathans и др., 1962).

Используя такую бактериальную бесклеточную систему, можно также выяснить, влияет ли добавление синтетических полирибонуклеотидов на синтез белка. Прежде всего был добавлен гомополирибонуклеотид, содержащий У; полиуридиловая кислота приводила к включению в белок L-фенилаланина (M. Nirenberg and J. Matthaei, 1961). Более того, оказалось, что:

1) образовавшийся полипептид представляет собой поли-L-фенилаланин;

2) другие аминокислоты не включаются в заметных количествах (однако, если изменяется концентрация магния или добавляется стрептомицин, то включаются заметные количества лейцина);

3) промежуточным соединением в этой реакции оказывается фенилаланин, связанный с тРНК.

Эти результаты означают, что, при наличии в нормальной информационной РНК подходящей последовательности из остатков У, в синтезирующийся белок, как правило, будет включаться фенилаланин. Это открытие было *первым шагом на пути к решению проблемы кодирования с помощью РНК*; другими словами, оно представляет собой первый случай установления в информационной РНК той последовательности нуклеотидов, которая определяет включение какой-то индивидуальной аминокислоты в белок.

Если синтетический полирибонуклеотид, содержащий У, смешивают с синтетическим полирибонуклеотидом, содержащим А, так чтобы образовались пары оснований обеих цепей, или они закрутились одна вокруг другой, то включение фенилаланина полностью или частично подавляется. Таким образом, синтетический полимер наиболее эффективен *in vitro* в состоянии одной нити (M. Singer и др., 1963), так же, как и информационная РНК *in vivo*.

Удалось также изучить влияние присутствия разных оснований в одном синтетическом полирибонуклеотиде на включение аминокислот в белок. Используя *полинуклеотидфосфорилазу*, субстратами которой служат рибонуклеотиддифосфаты, можно синтезировать *in vitro* полирибонуклеотиды, содержащие два или более разных рибонуклеотида. Анализ гетерополимера на ближайшее соседствование подтверждает, что действительно рибонуклеотиды расположены по длине полимера беспорядочно. Первые же анализы, проведенные в лабораториях Очоа и Ниренберга, сильно облегчались тем, что полифенилаланин был нерастворим в бесклеточной системе. Впоследствии для синтеза практически любого смешанного полинуклеотида использовали избыток уридиловой кислоты с тем, чтобы синтезированный белок выпадал в осадок, а на основании его анализа можно было бы определить количество и качество включившихся аминокислот. Так, для синтеза поли-УА, поли-УЦ и поли-УГ добавляли в 5 раз больше уридиндифосфата, чем аденозин-, цитидин- или гуанозиндифосфата. Для получения смешанных полинуклеотидов, содержащих УАЦ, УЦГ или УГА, использовали в 10 раз больше уридиндифосфата, чем аденозин-, цитидин- или гуанозиндифосфата.

Например, если в бесклеточную систему добавляли смешанный полирибонуклеотид, содержащий У и Ц, а затем определяли, какие аминокислоты, кроме фенилаланина, включились в белок, то среди них обнару-

живали пролин и серин. Следовательно, в состав букв кода для этих аминокислот входит по крайней мере один Ц. Таким же образом можно определить, как влияют на включение аминокислот другие смешанные полирибонуклеотиды. Кодирование таких аминокислот, как аланин и аргинин, требует присутствия трех разных нуклеотидов; таким образом, кодовое отношение (число нуклеотидов, требуемое для кодирования одной аминокислоты) равно по крайней мере трем. Не найдено аминокислоты, требующей для кодирования всех четырех типов нуклеотидов. На этом основании высказывается предположение о том, что в синтетических информационных РНК в аминокислоты транслируются триплеты нуклеотидов, т. е. триплетный код, заключенный в РНК, функционирует и в опытах *in vitro*.

Если в смешанном полинуклеотиде меняется соотношение уридиловой и цитидиловой кислот, то в случае избытка уридиловой кислоты включается больше серина, чем пролина. Однако при избытке цитидиловой кислоты получается обратный результат — включается больше пролина, чем серина. Если исходить из состава триплетов, то серин должен определяться триплетом 2У 1Ц, а пролин — 1У 2Ц. Заметьте, что на основании этих результатов нельзя определить ни последовательности нуклеотидов в триплете, ни порядка, в котором они считываются. Иными словами, несмотря на то, что для пролина буквами триплетного кода, заключенного в информационной РНК, служат 1У 2Ц, мы не знаем, какова их последовательность — УЦЦ, ЦУЦ или ЦЦУ. (Первый и последний триплеты различаются, так как одонитчатая молекула информационной РНК транслируется только в одном направлении.)

Можно предсказать относительную частоту появления разных триплетов в синтетическом полимере, если урацил встречается в 5 раз чаще, чем цитозин. Триплет УУУ встречался бы с частотой $5/6 \times 5/6 \times 5/6 = 125/216$. Хотя для буквенного кода 2У 1Ц возможны три способа расположения, одна из возможных последовательностей встречалась бы с частотой $5/6 \times 5/6 \times 1/6 = 25/216$; любая из трех возможных последовательностей 1У 2Ц встречалась бы с частотой $5/6 \times 5/6 \times 1/6 = 5/216$, а триплет ЦЦЦ — с частотой $1/216$. Таким образом, отдельные последовательности встречаются, соответственно, с относительной частотой, равной $125 : 25 : 5 : 1$. Следовательно, если действительно существует триплетный код, то в присутствии такого полирибонуклеотида было бы обнаружено, что в белок включается в 25 раз больше фенилаланина, чем серина, и в 25 раз больше фенилаланина, чем пролина. Хотя результаты, получаемые с разными синтетическими полимерами, иногда отличаются от ожидаемых примерно вдвое, в целом они очень хорошо согласуются с приведенными выше рассуждениями и служат весьма убедительным доказательством наличия в РНК триплетного кода. Существование триплетного кода подтверждается также тем, что информационная РНК для гемоглобина содержит по длине приблизительно 450 рибонуклеотидов (T. Staehlin и др., 1964), тогда как в состав α - и β -цепей гемоглобина входит около 150 аминокислот.

До сих пор все синтетические полирибонуклеотиды, которые при синтезе белка использовались в качестве информационных РНК, содержали по техническим причинам избыток У. Как отмечалось выше, получаемый белок состоит главным образом из полифенилаланина, нерастворимого в бесклеточной системе, благодаря чему его можно легко собрать и количественно определить в нем фенилаланин и другие аминокислоты. Такие опыты привели к открытию буквенного триплетного кода для 19 аминокислот. Наличие трех триплетов для лейцина — 1А 2У, 1Ц 2У, 1Г 2У кислот. Наличие трех триплетов для лейцина — 1А 2У, 1Ц 2У, 1Г 2У кислот. Показывает (как это следует из вышеприведенного рассуждения), что по крайней мере *in vitro* код оказывается вырожденным. Вырожденность существует также для аспарагина, который обладает кодонами 2А 1У и 1Ц 1А 1У, и для изолейцина с его кодонами 1А 2У и 2А 1У.

Триплетный код для тирозина представлен буквами 1А 2У. Но какова их истинная последовательность — АУУ, УАУ или УУА? Короткие последовательности рибонуклеотидов (олигорибонуклеотиды) можно удлинить со стороны нуклеозидных концов (3') с помощью полинуклеотид-фосфорилазы. Смесь олигорибонуклеотидов АУУ и ААУ (основание у 5'-конца всегда пишется в последовательности первым) удлиняется со стороны 3'-конца за счет остатков уридиловой кислоты. Когда полипептидный синтез исследуется в присутствии смешанных удлиненных полирибонуклеотидов — АУУУ... У или ААУУУ...У, то оказывается, что фенилаланин и тирозин включаются в значительных количествах, а изолейцин (который также имеет буквенный код 1А 2У) или аспарагин и лизин (буквенные коды 2А 1У) в заметных количествах не включаются. Поэтому вероятно, что основания в триплете для тирозина расположены в последовательности АУУ.

Другой метод определения последовательности оснований в кодонах использует мутации, вызывающие замещения отдельных аминокислот в гемоглобине (см. табл. 32—1), в белке вируса табачной мозаики (ВТМ), в триптофансинтетазе и в других белках. Мутации, возникающие спонтанно или под действием мутагенов, которые, как считается, приводят к замене отдельных оснований, по-видимому, сопровождаются изменением только одного основания. Некая мутация ВТМ вызывает замену тирозина (АУУ) на фенилаланин (УУУ); очевидно, мутант вызывает замену одного основания (А на У). В случае мутантной триптофансинтетазы тирозин (АУУ) заменен на цистеин (ГУУ), т. е., по-видимому, происходит замена А на Г. В α -цепи гемоглобина М_{Бостон} (см. стр. 428—429) гистидин (1А 1У 1Ц) в положении 58 заменен на тирозин (АУУ). Если происходит замена только одного основания — Ц на У, то кодон для гистидина должен начинаться с А и состоять из последовательности АЦУ, или АУЦ. В гемоглобине «Цюрих» гистидин (АЦУ или АУЦ) в положении 63 заменен на аргинин (1Г 1Ц 1У). Возможно, происходит замена А на Г, так что первым основанием в аргининовом кодоне будет Г, а сам кодон представлен последовательностью ГЦУ или ГУЦ. Если продолжить такого рода анализ, то для 19 и 20 аминокислот можно определить последовательность нуклеотидов в кодонах, содержащих урацил (Т. Jukes). Полученные последовательности (см. соответствующие графы на табл. 34—1) согласуются как с буквами триплетного кода и последовательностью оснований, определенными *in vitro*, так и с данными по 87 из 93 известных

Таблица 34—1

| Аминокислота | Кодоны, содержащие У | Кодоны, не содержащие У* | Дубликаты, общие для выходящих триплетов | Аминокислота | Кодоны, содержащие У | Кодоны, не содержащие У* | Дубликаты, общие для выходящих триплетов |
|--------------|----------------------|--------------------------|--|--------------|----------------------|--------------------------|--|
| Ала | ЦУГ | ЦАГ, ЦЦГ | Ц·Г | Лей | УАУ, УУЦ, УГУ | | У·У |
| Арг | ГУЦ | ГАА, ГЦЦ | Г·Ц | Лиз | АУА | ААА | А·А |
| Асп | УАА, ЦУА | ЦАА | ·АА, Ц·А | Мет | УГА | | |
| Асп | ГУА | ГЦА | Г·А | Фен | УУУ | | |
| Цис | ГУУ | | | Про | ЦУЦ | ЦЦЦ, ЦАЦ | Ц·Ц |
| Глу | АУГ | ААГ | А·Г | Сер | ЦУУ | АЦГ | |
| Гли | | АГГ, ААЦ | Г·Г | Тре | УЦА | АЦА, ЦГЦ | ·ЦА |
| Гли | ГУГ | ГАГ, ГЦГ | | Три | УГГ | | |
| Гис | АУЦ | АЦЦ | А·Ц | Тир | АУУ | | |
| Илей | УУА, ААУ | | | Вал | УУГ | | |

* Данные последовательности сходны с теми, которые приведены во второй колонке, но среди них нет последовательностей, повторяющихся среди кодонов для других аминокислот.

замещений отдельных аминокислот, которые предположительно произошли в результате замены одного основания. Несоответствия с данными, основанными на аминокислотных замещениях, относительно редки и большей частью, вероятно, возникают потому, что неизвестны все триплеты, а также в некоторых случаях, когда имеют место последовательные или одновременные изменения двух или трех оснований при замене одной аминокислоты на другую.

Способность синтетических полирибонуклеотидов, не содержащих У, стимулировать включение аминокислот, можно также исследовать, используя реагенты (например, трихлоруксусную кислоту), которые осаждают белки, растворимые в системах, где идет синтез полипептидов *in vitro*. Если синтезировать гомополирибонуклеотиды, содержащие А, Ц или Г (или смешанные полимеры из этих оснований), а затем испытывать их, то удастся обнаружить много кодирующих триплетов, не содержащих У. Например, полиА приводит к образованию полилизина, полиЦ — полипролина. Полинуклеотиды, богатые гуанином, работают плохо, возможно вследствие образования вторичной структуры за счет взаимодействий гуанин — гуанин. В упомянутой выше табл. 34—1 перечислены последовательности оснований в этих новых триплетах без У, причем они выбраны таким образом, чтобы не было дублирования нуклеотидных последовательностей, полученных для кодонов, содержащих У.

При изучении включения меченых аминокислот *in vitro* необходимо использовать очень длинные олигорибонуклеотиды, например цепи, состоящие из 500—1000 остатков уридиловой кислоты. Несмотря на то, что полиУ эффективно стимулирует включение фенилаланина в белок, отдельный тринуклеотид УУУ не обладает такой способностью. Вспомним, однако, что на первых стадиях синтеза белка необходима активация и присоединение аминокислот к индивидуальной молекуле тРНК. Эта «нагруженная» тРНК связывается с рибосомой и, управляемая информационной РНК, включается в конец растущей полипептидной цепи. ПолиУ обеспечивает связывание с рибосомой фен-тРНК; другие полирибонуклеотиды приводят к связыванию других специфических нагруженных тРНК.

Можно синтезировать или выделить олигорибонуклеотиды и исследовать их способность *in vitro* специфически связывать нагруженные молекулы тРНК с рибосомами (М. Nirenberg а. Р. Leder, 1964; Р. Leder а. М. Nirenberg, 1964). (Условились содержащий У тринуклеотид с 3'-терминальным фосфатом обозначать как УфУфУф, а с 5'-терминальным фосфатом — как фУфУфУ). Если используются тринуклеотиды фУфУфУ, фАфАфА и фЦфЦфЦ, то оказывается, что они управляют присоединением соответственно фен-, лиз- и про- тРНК; динуклеотиды на этот процесс не оказывают никакого влияния. Кроме того, тринуклеотиды с 5'-терминальным фосфатом более активны, чем без терминального фосфата, а тринуклеотиды с 2' (3')-терминальным фосфатом неактивны.

Из других работ известно, что кодоном для валина служит 2У 1Г. Порядок оснований можно определить, используя полиУГ, динуклеотиды, тринуклеотид ГфУфУ и его изомеры УфГфУ и УфУфГ. Оказывается, что связывание C^{14} — вал — тРНК с рибосомами определяют полиУГ и ГфУфУ, но ни динуклеотиды, ни тринуклеотиды УфГфУ и УфУфГ. ГфУфУ не влияет на связывание с рибосомами молекул тРНК, соответствующих другим 17 аминокислотам. Отсюда можно сделать вывод о том, что кодирующим триплетом для валина служит ГфУфУ; можно предсказать, что полимер ГУУГУУГУУ...ГУУ будет стимулировать включение в белок только валина. Аналогичное исследование позволило показать, что УфУфГ кодирует лейцин, а УфГфУ, по-видимому, кодирует цистеин.

Список кодонов, представленных в табл. 34—1, будет исправляться и пополняться (с помощью разных методов при определении *in vitro* некоторых последовательностей получаются противоречивые результаты). Тем

не менее, при изучении списка кодонов обнаруживается уже отмечавшееся ранее некоторое общее свойство — вырожденность кода. Например, два кодона для лейцина содержат с обоих концов У. Другими словами, они содержат один и тот же дублет, и их кодоны можно записать как У·У, где · может быть А или Ц. Принимается, что в последовательность оснований двух аланиновых кодонов не входит У, однако оба они содержат Ц и Г, как и последовательность, содержащая У, так что их можно представить общим дублетом Ц·Г, в котором · означает У, А или Ц. Этот и другие подобные дублеты указаны в таблице. В чем состоит смысл таких общих дублетов, обнаруженных при кодировании с помощью РНК *in vitro*, остается неизвестным, так же как неизвестно, насколько часто в информационной РНК *in vivo* встречаются триплеты, не содержащие У.

В пользу существования вырожденности кода *in vivo* свидетельствуют данные о том, что аминокислотный состав белков почти не меняется при сильных сдвигах в составе ДНК $\left(\frac{A+T}{G+C}\right)$. Лейцил — тРНК *E. coli* можно

разделить на три типа, каждый из которых обладает *in vitro* разными кодирующими свойствами (G. von Ehrenstein and D. Dais, 1963). Первый тип предпочтительно реагирует с полиУЦ, второй с полиУ и сополимерами, богатыми У (в том числе полиУЦ), а третий тип лучше всего использует полиУГ. После того, как было обнаружено, что лейцин переносится разными аминокислотами, появилась возможность дать объяснение тем наблюдениям *in vitro*, в которых была обнаружена вырожденность кода для лейцина (по крайней мере четыре разных триплета) и двусмысленность кодона УУУ (так как он служит кодоном и для лейцина и для фенилаланина). Предполагая, что каждому типу молекулы тРНК соответствует только один участок ДНК, можно использовать данные Г. Гудмен и А. Рич (1962); Д. Джакомони и С. Спителман (1962) (см. ссылки в главе 33) о существовании в ДНК *E. coli* около 40 отрезков, комплементарных тРНК, не только для подтверждения вырожденности кода, но и для оценки степени этой вырожденности. В клетках *E. coli* уже обнаружено 29 типов молекул индивидуальных тРНК для 16 аминокислот (J. Goldstein and др., 1964).

Хотя ДНК и полипептиды, которые она определяет, представлены молекулами, вытянутыми в длину, очень важно определить, действительно ли линейное расположение аминокислот в полипептиде точно определяется линейными свойствами ДНК; иными словами, существует ли между ними *коллинеарность*. Это можно проверить на мутантах фага Т4, образующих незаконченные молекулы белка головки фага. С помощью рекомбинации эти мутанты картируются в линейной последовательности. При анализе белка головки фага оказывается, что длина образовавшегося участка молекулы точно пропорциональна расстоянию по карте от одного конца гена. Эти данные доказывают существование коллинеарности. (A. Sarabhai and др., 1964; C. Yanofski and др., 1964; M. Reichmann, 1964).

Несмотря на отмеченную вырожденность и двусмысленность кода, одинаков ли код в общем и целом для всех организмов? И если это так, то не является ли код по существу универсальным? Уже говорилось, что нечто очень сходное с гемоглобином кролика можно синтезировать в бесклеточной системе, полученной частично из ретикулоцитов кролика, а частично из *E. coli*. Как уже отмечалось, в экстрактах *E. coli* РНК, полученная из фага f2, индуцирует синтез белка оболочки фага. Эта РНК ведет также к синтезу белка оболочки фага f2 в экстрактах *Euglena gracilis*. ДНК, полученная из животных вирусов (оспы и полиомы), оказывается инфекционной для компетентных клеток *Bacillus subtilis*: при смешивании вирусной ДНК с бактериями образуются интактные вирусные частицы, которые могут заражать обычного хозяина — животное. В некоторых бесклеточных системах из тканей животных, которые можно стимулиро-

вать д
лириб
повно
у сам
Г + Ц
эти да
ганизм
тидов

ЗАКЛ

Исслед
код д
начина
вероят
таты
возмож

Эти
теза in
а такж
вания
тельно
in vitro

In
код, за

ВОПРО

34-1
живущ
34-2
ной це



М. В. НИРЕНБЕРГ, Ф. ЛИПМАН И С. ОЧОА
(слева направо) (1962 г.)

вать добавлением экзогенных информационных РНК, синтетические полирибонуклеотиды *in vitro* ведут себя при включении аминокислот в основном так же, как и в бактериальных бесклеточных системах. Наконец, у самых разных организмов имеется явная корреляция между содержанием Г + Ц и процентом определенных аминокислот, включившихся в белок. Все эти данные подтверждают предположение о том, что у всех ныне живущих организмов существует один основной код, используемый при синтезе полипептидов, даже если и имеются некоторые различия, вызванные мутациями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование области *r II* фага T4 *in vivo* показывает, что генетический код для аминокислот считывается в одном направлении, по-видимому начиная с одной фиксированной точки на информационной РНК. Весьма вероятно, что код состоит из следующих друг за другом триплетов. Результаты экспериментов позволяют считать код вырожденным, а почти все возможные кодоны осмысленными.

Эти предположения были доказаны при изучении полипептидного синтеза *in vitro* с помощью природной и синтетической информационной РНК, а также при исследовании мутантов с замещениями аминокислот и связывания тРНК с рибосомами *in vitro*. Удастся также определить последовательности оснований в триплетах, которые осуществляют кодирование *in vitro*.

In vivo ДНК и полипептид, который она определяет, колинеарны; код, заключенный в РНК, в основном универсален.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

34-1. Одинаков ли генетический код для аминокислот у всех свободно живущих организмов? Приведите необходимые доказательства.

34-2. Сравните репликацию вирусной РНК с репликацией полипептидной цепи.

34-3. Какие данные можете Вы представить в пользу того, что для прикрепления информационной РНК к рибосоме не требуется спаривания комплементарных оснований на большом участке?

34-4. Представьте доказательства в пользу того, что информационная РНК однострочна.

34-5. Какие исходные материалы необходимы для получения смешанного полирибонуклеотида в отсутствие затравки? В присутствии затравки?

34-6. Как Вы считаете, был ли первый генетический код вырожденным?

34-7. Вычислите относительную частоту встречаемости триплетов УУУ, УУА, ААУ, УАЦ, ААА, ЦЦЦ в последовательностях полимера, синтезированного из рибонуклеотидов У, А, Ц, присутствующих соответственно в относительных концентрациях 6, 1, 1.

34-8. Используя для синтеза смешанного полирибонуклеотида полинуклеотидфосфорилазу и рибонуклеотидфосфаты А, У, Г и Ц в относительных концентрациях 4, 3, 2, 1, определите в полирибонуклеотиде соотношение следующих последовательностей (все они читаются только в одном направлении):

- а) дубликаты АУ; АЦ; ЦА;
- б) гомотриплеты; гетеротриплеты;
- в) квадриплет АУЦГ.

34-9. Составьте минимальный список компонентов, необходимых для функционирования и воспроизведения самого простого свободно живущего организма, который вы можете себе представить; определите минимальное число нуклеотидов, необходимых для осуществления тех функций, которые приписываются генетическому материалу, если он представлен РНК; если это ДНК. Сравните полученные Вами цифры с числом нуклеотидов в ВТМ и фХ174. Какие выводы вы делаете?

34-10. Предложите опыты, которые позволят получить достаточно чистую тРНК, акцептирующую фенилаланин; тРНК, акцептирующую лизин.

34-11. Цистеин, прикрепленный к соответствующему нормальному типу тРНК, превращается в аланин при восстановлении никелем Рэя. Предложите прямой опыт с использованием синтетических полирибонуклеотидов для проверки гипотезы, согласно которой тРНК действует как адаптор, определяя положение аминокислот на матрице.

34-12. Как Вы можете объяснить наблюдение Л. Гроссмана, что воздействие ультрафиолетовыми лучами на полиуридиловую кислоту не только приводит к подавлению включения фенилаланина при исследовании синтеза белка *in vitro*, но и сопровождается также повышенным включением серина? Можно ли связать Ваше объяснение с тем наблюдением, что в норме полиуридиловая кислота кодирует не только фенилаланин, но и лейцин?

34-13. Как вы можете объяснить то наблюдение Магни (см. ссылки к главе 30), что в случае некоторых мутантов дрожжей, индуцированных ультрафиолетовыми лучами, нормальные мутации (реверсии) возникают в 6—20 раз чаще в процессе мейоза, чем при митозе?

34-14. Ряд точечных мутантов в области *r* II можно рассматривать как результат транзиций типа А : Т → Г : Ц или Г : Ц → А : Т, исходя из их способности к реверсии после обработки разными химическими мутагенами. Добавление к питательной среде фторурацила не приводит к образованию фенотипа *r*⁺ ни в одном из мутантов, которые в мутировавшей точке ДНК, по-видимому, содержат пару Г : Ц. С другой стороны, фторурацил приводит к образованию фенотипа *r*⁺ для 17 мутантов из 46, которые, по-видимому, в точке мутации содержат пару А : Т. Какие выводы Вы можете отсюда сделать?

34-15. Цепь гемоглобина всегда синтезируется, начиная с N-конца. Какое отношение имеет это наблюдение к решению дилеммы о том, как осуществляются транскрипции: одним блоком или двумя?

35-16. Сколько более У, из комбинирующихся У?

ЛИТЕРАТУРА

A. Campbell, *biol.*, 1963

S. P. Champre, *Approach Sci. U. S.*

Ф. Крик, *«Мир»*, 1963

F. H. C. Crick, *Res.*, 1963

H. Frankel-Conrat, *J. Goldstein, T. Li SRNA.*

H. M. Goodman, *tion to the Sci. U. S.*

M. Grunberg-Manag, 1963, 1,

Джасак Т. Код молекулы

P. Leder and M. O. Leder, *leotide Sequence Sci. U. S.*

D. Nathans, *Genetics of Coliphage*

(M. Ниренберг), М., изд-во

M. Nirenberg, *Science*, 145, 1399

M. W. Nirenberg, *E. coli and the Acad. Sci.*

M. E. Reichman, *Code.—Principles*

M. F. Singer, *Template Synthesis and*

49, 392.

1964, v. 3

G. von Ehrenstein, *Properties in Sci. U. S.*

A. J. Wahba, *Synthetic U. S.*, 1963

B. Weissblum, *Degeneration*

C. R. Woese, *Science*, 1963

C. Yanovsky, *Biological Chemistry of Genes*

51, 266.

См. Приложение Крика.

35-16. Сколько можно получить триплетов, содержащих один или более У, из 64 возможных считываемых в одном направлении триплетов, комбинируя сочетание АУГЦ? Сколько получится триплетов, не содержащих У?

ЛИТЕРАТУРА

- A. Campbell. Fine Structure Genetics and its Relation to Function.—Ann. Rev. Microbiol., 1963, 17, 49.
- S. P. Champe and S. Benzer. Reversal of Mutant Phenotypes by 5-Fluorouracil: An Approach to Nucleotide Sequences in Messenger — RNA.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 532.
- Ф. Крик. Генетический код (I).—Сб. «Структура и функции клетки». М., изд-во «Мир», 1964).
- F. H. C. Crick. The Recent Excitement in the Coding Problem.—Progr. Nucleic Acid Res., 1963, 1, p. 163.
- H. Frankel-Conrat. The Genetic Code of a Virus.—Scient. Amer., 1964, N 211, 47.
- J. Goldstein, T. P. Bennett and L. C. Craig. Countercurrent Distribution Studies of *E. coli* SRNA.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 119.
- H. M. Goodman and A. Rich. Formation of a DNA — Soluble RNA Hybrid and its Relation to the Origin, Evolution and Degeneracy of Soluble RNA.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 2101.
- M. Grunberg-Manago. Polynucleotide Phosphorylase.—Progr. Nucleic Acid. Res., 1963, 1, 93.
- Джакс Т. Кодоны и замены аминокислот в белках. В сб.: Информационные макромолекулы. М., изд-во «Мир», 1965, стр. 371.
- P. Leder and M. W. Nirenberg. RNA Codewords and Protein Synthesis, III. On the Nucleotide Sequence of a Cysteine and a Leucine RNA Codeword.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1521.
- D. Nathans, G. Notani, J. H. Schwartz and N. D. Zinder. Biosynthesis of the Coat Protein of Coliphage f2 by *E. coli* Extracts.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1424.
- (М. Ниренберг. Генетический код (II).—Сб. «Структура и функции клетки». М., изд-во «Мир», 1964).
- M. Nirenberg and P. Leder. RNA Codewords and Protein Synthesis.—Science, 1964, 145, 1399.
- M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei. The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. coli* upon Naturally Occurring or Synthetic Polynucleotides.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 1588.
- M. E. Reichmann. The Satellite Tobacco Necrosis Virus: A Single Protein and its Genetic Code.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1009.
- M. F. Singer, O. W. Jones and M. W. Nirenberg. The Effect of Secondary structure on the Template Activity of Polynucleotides.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 392.
- Synthesis and Structure of Macromolecules.—Cold Spring Harb. Sympos. Quant. Biol., 1964, v. 38.
- G. von Ehrenstein and D. Dais. A. Leucine Acceptor sRNA with Ambiguous Coding Properties in Polynucleotide—Stimulated Polypeptide Synthesis.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 81.
- A. J. Wahba, R. S. Gardner, C. Basilio, R. S. Miller, J. F. Speyer and P. Lengyel. Synthetic Polynucleotides and the Amino Acid Cod. VIII.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 116.
- B. Weisblum, F. Gonano, G. von Ehrenstein and S. Benzer. A. Demonstration of Coding Degeneracy in the Synthesis of Protein.—Proc. Nat. Acad. U. S., 1965, 53, 328.
- C. R. Woese, R. T. Hinengardner and J. Engelberg. Universality in the Genetic Code.—Science, 1964, 144, 1030.
- C. Yanosky, B. C. Carton, J. R. Guest, D. R. Helinski and M. Henning. On the Colinearity of Gene Structure and Protein Structure.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 266.
- См. Приложение X. Другие ссылки можно найти в конце Нобелевской лекции Крика.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ГЕНОВ

Экспериментально показано, что для синтеза ДНК *in vitro* в биологических системах требуются следующие компоненты: ДНК в качестве затравки и матрицы; нуклеозид-5-трифосфаты аденина, тимина, цитозина и гуанина; ионы магния; ДНК-полимераза в водном растворе соответствующих рН и температуры. Добавляя ДНК-полимеразу *E. coli*, можно получить *in vitro* продолжительный синтез ДНК, протекающий фактически бесконтрольно и не регулируемый до тех пор, пока не истощится поступление одного из исходных продуктов, или пока процесс не будет ограничен каким-либо другим фактором. Синтез ДНК *in vitro* можно контролировать, изменяя количество одного или нескольких необходимых факторов. Например, мы можем удалить один из трифосфатов, содержащих основание, присутствующее в затравке-матрице. Уменьшая количество такого трифосфата или используя трифосфат, содержащий аналог основания, можно контролировать скорость реакции, а также количество образующейся ДНК. Реакцию можно затормозить или даже заставить идти в противоположном направлении, добавляя большие количества пирофосфата. Другими словами, имеется много способов, с помощью которых биохимик может регулировать *in vitro* синтез ДНК. Эти сведения весьма важны для того, чтобы ответить на вопрос: как регулируется синтез генов *in vivo*?

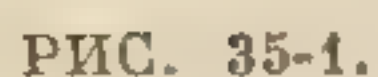
Этот вопрос заранее заключает в себе предположение, что синтез ДНК *in vivo* регулируется, а многочисленные данные, которые частично уже приводились, подкрепляют такое мнение. Существование регуляции синтеза ДНК на клеточном уровне обнаруживается в наблюдениях, показывающих, что синтез ДНК идет в интерфазе и прекращается в процессе деления ядра. Доказательство регуляции на уровне генома основывается на том, что при остановке синтеза ДНК содержание ее в ядре является эуплоидным ($\pm 10\%$), даже если ядро не делится и становится полиплоидным, или полинемым, т. е. количество ДНК в нем кратно нормальному содержанию ДНК. Синтез ДНК регулируется по времени как в разных хромосомах (гетерохроматические и эухроматические хромосомы реплицируются в разные промежутки времени), так и внутри хромосомы (гетерохроматические и эухроматические районы внутри данной хромосомы синтезируются в разное время в процессе интерфазы). Следует отметить, что присутствие «естественной *dAT*» и ее количество у разных видов крабов, по-видимому, контролируется генетически (M. Smith, 1963).

СИНТЕЗ ДНК У БАКТЕРИИ, НЕ ЗАРАЖЕННЫХ И ЗАРАЖЕННЫХ ФАГОМ

Рассмотрим регуляцию синтеза генов на примере биохимических путей обмена (см. рис. 35-1), приводящих к синтезу четырех обычных типов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов в незараженных клетках *E. coli*. Поскольку сейчас широко принимается гипотеза о том, что гены определяют синтез всех белков организма, и так как образование ДНК — это ферментативный процесс, то и контролирование синтеза генов также осуществляется с помощью генов.

рис. 35-1
Путь
Прер
ми к
d —
T —
2 —

Рибонук
в присутст
ветствующи
(A. Larsson
Дезокситим
фата в рез
в присутст
требует дл
тимин-зави
вую кислот
что в фаге
тимидилатс
рым свойст
дин-5-моно
источник —
пирофосфа
5-дифосфат
5-монофосф
гуанина и
фосфорили
зультате р
 $dXФ + A$
дифосфат),
метить, что
зараженны
клетках.)
превращаю
рилирующ
следующим



Прерывистыми стрелками обозначены реакции, идущие в зараженных Т-четными фагами клетках, а волнистыми — реакции, блокированные в таких клетках
 δ — дезоксирибо-, ОМЦ — оксиметилцитидин; Ц — цитидин; Г — гуанозин; А — аденозин;
 Т — тимидин; У — уридин; АТФ — аденозин 5'-трифосфат; 1 — тимидилатсинтетаза;
 2 — оксиметилаза; 3 — δЦТФ-δЦДФаза

дифосфат), где \bar{X} — цитидин, аденозин, гуанозин или тимидин. (Следует отметить, что $d\text{ГМФ}$, $d\text{ТМФ}$ и $d\text{ЦМФ}$ -киназы, образующиеся в клетках *E. coli*, зараженных фагом, отличаются от аналогичных ферментов в незараженных клетках.) Образовавшиеся дезоксирибозид-5'-дифосфаты вероятнее всего превращаются в 5'-трифосфаты с помощью других специфических фосфорилирующих ферментов — нуклеозиддифосфаткиназ. Реакция протекает следующим образом:

$d\text{XФФ} + \text{АТФ} \xrightarrow{\text{нуклеозиддифосфаткиназа}} d\text{XФФФ} + \text{АДФ}.$

Этой реакцией заканчивается целый ряд процессов, ведущих к образованию дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, необходимых для репликации ДНК *E. coli*.

Выше мы отметили, что инфицирующий вирулентный фаг несет соответствующую информацию для образования специфической тимидилатсинтетазы и, вероятно, для специфических нуклеозидмонофосфаткиназ. Это заключение позволяет предполагать, что вирулентные фаги содержат необходимые предписания для синтеза ряда специфических белков. Фагоспецифическая РНК появляется через 2 мин. после внедрения ДНК Т-фага; через 4 мин. появляются специфические для фага белки, и через 6 мин. синтезируется фаговая ДНК — в 5 раз быстрее, чем ДНК незараженных клеток. ДНК хозяина быстро разрушается после заражения Т-четными фагами. Механизм этого явления до конца не ясен; предполагается, что в нем участвует новая ДНКаза, которая появляется после заражения фагом. Примерно через полчаса после заражения образуется и в результате лизиса освобождается 100—200 новых фагов. Наличие такой активности заставляет нас предположить, что после заражения вирулентным фагом синтез всей ДНК и информационной РНК в бактериальной клетке управляется фаговой ДНК. Тот факт, что ДНК *E. coli* содержит цитозин, тогда как Т-четные фаги содержат 5-оксиметилцитозин (ОМЦ), к которому у разных Т-четных фагов прикреплена в разных количествах глюкоза, дает возможность проверить эту гипотезу другим способом.

Через несколько минут после заражения четным фагом дезоксицитидин-5'-монофосфат превращается в $d\text{ОМЦФ}$ с помощью оксиметилазы. Этот фермент образуется заново, так как незараженные клетки, или клетки, зараженные фагом Т5 (не содержащим в ДНК ОМЦ), не обладают оксиметилазной активностью. Под действием киназы, также образующейся только в клетках, зараженных Т-четным фагом, $d\text{ОМЦФ}$ фосфорилируется до $d\text{ОМЦФФФ}$. В клетках, зараженных фагом, все нуклеозидмонофосфаткиназы, соответствующие Г, Т и ОМЦ, могут быть представлены одним новым ферментом. В клетках, зараженных Т2-фагом, появляется другой новый фермент, который отщепляет пирогосфат от $d\text{ЦТФ}$ и ортофосфат от $d\text{ЦДФ}$, превращая их в $d\text{ЦМФ}$, который, как описывалось, служит субстратом при образовании $d\text{ОМЦФ}$. Дефосфорилирующая активность этого фермента, ЦТФазы, в 60 раз выше активности фосфорилирующей киназы, причем он не действует на $d\text{ОМЦФФФ}$. Такой механизм обеспечивает удаление цитозина из ДНК Т-четных фагов.

Биохимические пути, описанные в клетках, незараженных и зараженных Т-четным фагом, приводят к синтезу $d\text{ОМЦФФФ}$, $d\text{АТФ}$, $d\text{ГТФ}$ и $d\text{ТТФ}$ — то есть субстратов, необходимых для синтеза ДНК Т-четных фагов с помощью ДНК-полимеразы. Как и для других ферментов, индуцированных фагом, в зараженных клетках активность ДНК-полимеразы очень высока. Отличается ли новая ДНК-полимераза, вырабатываемая в ответ на заражение фагом Т2, от ДНК-полимеразы, образующейся в незараженных клетках *E. coli*? ДНК-полимеразы из незараженных и зараженных клеток различаются по антигенным свойствам, по распределению при хроматографии и по чувствительности к действию специфических ядов. Более того, ДНК-полимераза может использовать в качестве матрицы-затравки нативную однонитчатую ДНК, тогда как полимеразы из зараженных клеток на такой матрице не работает. При добавлении однонитчатой матрицы-затравки полимеразы *E. coli* увеличивает количество ДНК в 10—20 раз, тогда как полимеразы из зараженных клеток даже не удваивает количества ДНК. Поэтому мы можем заключить, что в клетках *E. coli*, зараженных Т2, образуется новая ДНК-полимераза, Т2 — ДНК-полимераза.

Как уже отмечалось, в ДНК фагов T2, T4 и T6 глюкоза, связанная с ОМЦ, распределяется по-разному. Остатки глюкозы прикрепляются к ОМЦ полимера ДНК при участии ферментов, называемых глюкозилтрансферазами. Эти ферменты переносят глюкозу с уридиндифосфатглюкозы (УДФГ) (не показаны на рис. 35—1) на ОМЦ-остатки в ДНК. Такие ферменты не найдены в незараженных клетках или клетках, инфицированных фагом T5. Очевидно, они индуцируются фагом. Заметьте, что глюкозилтрансферазы реагируют с полидезоксирибонуклеотидами.

Итак, мы видим, что после заражения T-четным фагом индуцируются новые ферменты, осуществляющие специфический синтез только вирусной ДНК, и нейтрализующие ферменты хозяина, способные мешать этому процессу. Известно также, что новые ферменты ускоряют синтез вирусной ДНК, участвуя в тех же реакциях, которые идут под действием ферментов хозяина. (Например, фаг индуцирует образование тимидилатсинтетазы, отличающейся от тимидилатсинтетазы хозяина.) Этот результат не только свидетельствует о том, что вирусная ДНК приводит к распаду ДНК хозяина, но и помогает понять, как синтез ДНК регулируется генетически в системе T-четный фаг — *E. coli*.

РАЗЛИЧИЯ В СОСТАВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, НЕСУЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ

Состав оснований двунитчатой ДНК, содержащей А, Т, Ц и Г, можно определить по плавучей плотности при ультрацентрифугировании, а также путем измерения температуры ее денатурации (плавления). Несоответствие состава оснований, получаемого обоими методами (I. Tagkhashi a. T. Margur, 1963) для ДНК фага PBS1 (а также PBS2), объясняется тем, что весь тимин в ДНК этих фагов заменен на урацил, и состав ее оснований следующий: А = 0,359, У = 0,359, Г = 0,134 и Ц = 0,147. В ДНК хозяина этого фага, *Bacillus subtilis*, содержится тимин, а не урацил. Очевидно, в своем собственном геноме фаг несет информацию, которая обеспечивает включение в ДНК dУМФ вместо dТМФ.

Фаг PBS1 может трансдуцировать некоторые генетические маркеры своего хозяина. Такие трансдуцирующие фаги, как P22 и λ , обладают ДНК, сходной по составу с ДНК хозяина. В нашем случае содержание Г + Ц у хозяина и фага резко различается, составляя соответственно 43 и 28%. Следовательно, система фаг PBS1 (PBS2) — *Bacillus subtilis*, по-видимому, представляет собой исключительно удобный случай для исследования механизма трансдукции, а также генетики, биосинтеза и гомологии ДНК хозяина и фага.

ОМЦ, с которым связана глюкоза, или свободный ОМЦ и У, — это не единственные новые основания ДНК, включение которых приводит к генетически определяемым изменениям ее состава (на стр. 270, 271 к генетически определяемым изменениям ее состава (на стр. 270, 271 уже указывалось, какие различные основания могут находиться в нативной ДНК.) В ДНК могут появляться и другие пиримидины. 5-метилцитозин можно обнаружить у высших организмов, например у пшевицы, млекопитающих, рыб и насекомых, причем у растений 5-метилцитозина больше, чем у животных. С другой стороны, 5-метилцитозина нет у многих микроорганизмов — бактерий, актиномицетов, дрожжей и у родственных им организмов — водорослей и простейших. Сообщалось, что в ДНК находятся следовые количества 5-рибозилурацила. Наконец, тимин, по-видимому, замещен на бромурацил в инфекционном вирусе ринотрахеита крупного рогатого скота (J. Stevens a. N. Groman, 1963), а у фага он замещен на 5-оксиметилурацил (D. Roscoe a. R. Tucker, 1964).

ДНК может содержать и разные пурины. Хотя 5-метиламинопурин (6-метиладенин) не найден в ДНК актиномицетов, дрожжей, высших растений или высших животных, он обнаружен у некоторых бактерий, напри-

мер, у *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Diplococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis bovis* и у соответствующих бактериофагов. Не более 0,7% всех оснований составляет 5-метиламинопурин. Сообщалось, что в ДНК содержатся следы 2-метиламиногуанина, 6-диметиламинопурина, 1-метилгуанина и 2-метиладенина. Однако в отличие от данных по пиримидинам, неизвестны случаи, чтобы в ДНК, образующейся в нормальных условиях, обычные пурины (А или Г) заменялись целиком или в заметных количествах другим пурином.

Интенсивное включение в ДНК 5-бром урацила, 5-йодурацила, 5-хлор урацила, 5-фторурацила, тиюрацила или 8-азагуанина может происходить, когда культура тканевых клеток или бактерий выращивается в среде, содержащей эти соединения. Чтобы получить такое включение, надо создать особые условия питания, и степень включения будет частично зависеть от специфических свойств исследуемого соединения. Поскольку включение зависит также от природы штамма, то такое исследование может способствовать пониманию природы генетического контроля синтеза ДНК. 5-йоддезоксипуридин включается в хромосомы кончика корешка широко распространенного бобового растения *Vicia faba*.

Известны разные естественные аналоги аденозина (S. Cohen, 1963): α -рибозилдиметилбензимидазол, небуларин, псикофуранин, кордицепин, туберцидин и пурамицинаминонуклеозид. Некоторые из этих соединений могут фосфорилироваться, однако ни один из них не был найден в полинуклеотидах. Было бы интересно узнать, как в клетке генетически контролируется образование этих рибозидов и как предотвращается их включение в полимерные нуклеиновые кислоты.

Сейчас уже наступило время поинтересоваться, в чем же может заключаться генетическая природа разделяющих полипептиды участков, которые, как предполагалось, расположены периодически вдоль нитей ДНК. Эти сведения были бы уместны в настоящем разделе, так как такие разделяющие участки могли бы служить естественными концами молекул нуклеиновых кислот, несущих генетическую функцию. *In vitro* с помощью ДНК-матрицы и ДНК-полимеразы, активируемой магнием, можно (стр. 303) присоединить риботид к концу молекулы ДНК и синтезировать смешанный полинуклеотид, состоящий частично из РНК, а частично из ДНК. Идут ли такие реакции *in vivo*? Было бы очень важно изучить механизм регуляции, с помощью которого в одном зрелом фаге оказывается двунитчатая ДНК, а в другом — одонитчатая.

Ответы на некоторые из этих вопросов могли бы в конце концов подвести нас к объяснению механизма репликации хромосомы *E. coli*. Как отмечалось на стр. 340, кольцевая хромосома *E. coli* начинается репликацию *in vivo* с фиксированной точки. Очевидно, синтез двух новых нитей идет параллельно: одна комплементарная нить растет с нуклеозидного конца, а другая с нуклеотидного (J. Cairns, 1964; P. Fong, 1964). Эта ситуация противоположна антипараллельному синтезу комплементарных нитей ДНК *in vitro*. Вторая проблема, связанная с синтезом *in vivo*, касается раскручивания ДНК. Предполагалось, что начальная точка синтеза ДНК служит своеобразным центром, вращение которого обеспечивает раскручивание.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ГЕНОВ, СОСТОЯЩИХ ИЗ РНК

Вирусы, содержащие РНК (f2, ВТМ, вирус полиомиелита), используют эту РНК как информационную при образовании РНК-синтетаз, необходимых для репликации *in vivo* комплементарной РНК на РНК-матрице. Хотелось бы знать, изменчива ли «генетическая» РНК (в том смысле, в котором эта изменчивость рассматривалась для ДНК) и в какой степени эта изменчивость регулируется генотипом. В этой связи следует отме-

тять, что при заражении вирусом полиомиелита подавляется синтез РНК хозяина и индуцируется синтез вирусной инфекционной РНК. Гуанидин в концентрации 0,001M подавляет синтез вирусной РНК (J. Holland, 1963). После заражения ВТМ цитоплазматическая рибосомная РНК распадается, а освобождающиеся рибонуклеозиды используются при синтезе РНК ВТМ (K. Reddi, 1963). С другой стороны, ни белок хозяина, ни РНК хозяина не включаются в потомство фага φR17, содержащего РНК (D. Ellis a. W. Paranchych, 1963).

«ГЕНЕТИЧЕСКАЯ» ДНК $\xrightarrow{\text{транскрипция}}$ «ГЕНЕТИЧЕСКАЯ» РНК

Существование частиц-убийц (*ми*) у *Paramecium*, так же как и подобных бактериальных эндосимбионтов λ и χ (см. стр. 387), зависит от генов хозяина, локализованных в микронуклеусе. Здесь участвуют два несцепленных доминантных гена M_1 и M_2 , каждый из которых независимо может поддерживать рост и размножение *ми*-частиц. Чувствительные особи, не убийцы, но содержащие ген M_1 , ген M_2 или оба этих гена, не порождают спонтанно *ми*-частиц; следовательно, эти гены не участвуют в непосредственном образовании *ми*-частиц. Если же после конъюгации доминантные M -гены «убийцы» замещаются другими, и образовавшийся эксконъюгант содержит гены m_1, m_1, m_2, m_2 , то через 8—18 делений *ми*-частицы (которые содержат ДНК и которые можно наблюдать), а вместе с ними и фенотип «убийцы» исчезают. Это задержавшееся исчезновение *ми*-частиц происходит внезапно, так как клетка сначала содержит много частиц, а потом они полностью исчезают. Поэтому предполагается, что M -гены контролируют существование *ми*-частиц с помощью продуктов этих генов, называемых *метагонами*.

Многочисленные опыты подтверждают эту гипотезу. У *Paramecium* было также найдено, что:

- 1) достаточно одного метагона для поддержания многих *ми*-частиц;
- 2) метагоны реплицируются редко, либо вообще не реплицируются;
- 3) метагон может переходить через цитоплазматический мостик от одного члена конъюгирующей пары к другому;
- 4) в отсутствие M -гена содержание метагона при последующих делениях падает;
- 5) в норме в каждой особи-убийце содержится около 1000 метагонов.

Более того, рибонуклеаза разрушает метагоны; следовательно, РНК является их важной составной частью. *Ми*-частицы разрушаются сразу, при первом же делении после того, как метагоны удаляются из клетки с помощью рибонуклеазы. Метагоны могут синтезироваться через два деления после обработки РНК-азой, если присутствует ген M^1 . Последующие результаты показали, что метагоны представляют собой информационную РНК с высоким содержанием Г — Ц. Таким образом, существование эндосимбионта регулируется с помощью информационной РНК хозяина. Метагоны могут попасть не только в другие парамеции, но и в другие простейшие — *Didinium*. Последние получают метагоны и *ми*-частицы, если их кормить парамециями, которые содержат эти компоненты. РНК метагонов, полученная из *Didinium* или парамеций, может давать гибриды с ДНК из парамеций с M -генами и в меньшей степени с ДНК из *m*-парамеций. С ДНК из *Didinium* гибриды не образуются. Поэтому мы считаем, что гены M у *Didinium* отсутствуют. Тем не менее метагоны в *Didinium* не только существуют, но и размножаются (I. Gibson a. T. Sonneborn, 1964). Эти данные заставляют предполагать, что у *Paramecium* репликация РНК метагонов каким-то образом подавляется, хотя эта РНК довольно долго сохраняется в качестве информационной. В этом

¹ Предшествующее изложение основано на работе И. Джигсона и др. (1963).

отношении РНК метагонов сходна с ДНК при abortивной трансдукции. У парамеции РНК метагона ведет себя как вирусная РНК, которая порождается клеткой, но неспособна к репликации; у *Didinium* клетка не может ее породить, но РНК метагона может размножаться самостоятельно. Очень важно узнать как можно больше о природе и происхождении фермента, обеспечивающего репликацию метагона, а также о механизме, который в определенных условиях подавляет или препятствует размножению метагона. Иногда генетический контроль репликации РНК со стороны хозяина может осуществляться с помощью интерферонов — белков (по-видимому, синтезированных с помощью информационной РНК клетки), которые подавляют репликацию определенных вирусов (R. Lockhart, 1964).

Вышеприведенные данные показывают, что *in vivo* транскрипция генетической ДНК может приводить к образованию генетической РНК. Мы уже отмечали, что при транскрипции *in vitro* РНК может продуцировать ДНК (стр. 303). Вирус саркомы Рауса (ВСР) инфицирует клетки куриного эмбриона; этот вирус содержит РНК, и из клеток саркомы Рауса можно выделить инфекционную РНК. Если синтез ДНК подавить вскоре после обработки клеток ВСР, то образование потомства вируса прекращается; однако, если ингибирование происходит позднее, то вирус размножается. Опыты по гибридизации РНК с ДНК показывают, что после заражения ВСР клетка куриного эмбриона синтезирует ДНК, гомологичную вирусной РНК (H. Temin, 1964). Такой ДНК нет до заражения, и она не гомологична молекулам РНК, не связанным с ВСР. Было высказано предположение, что эта новая ДНК представляет собой стадию провируса при размножении ВСР, напоминающую стадию профага у фага λ . Очевидно, здесь имеет место случай транскрипции *in vivo* в направлении от генетической РНК к генетической ДНК, причем транскрипция, вероятно, может идти и в обратном направлении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описываются некоторые биохимические реакции, ведущие к синтезу ДНК бактерии и фага. В этих реакциях участвует большое количество специфических ферментов. Поскольку ферменты непосредственно зависят от действия генов, то мы в какой-то степени рассмотрели, как осуществляется генетический контроль синтеза генов. Обнаружение в ДНК оснований, отличающихся от А, Т, Г и Ц, способствовало и будет способствовать дальнейшему изучению этой проблемы. Для того чтобы до конца понять, в чем заключается регуляция *in vivo* функций генетических нуклеиновых кислот, необходимо дальнейшее исследование факторов, определяющих состав полинуклеотидов, их длину, их одно- или двуни́тчатость. *In vivo* может идти транскрипция генетической ДНК в генетическую РНК (метагоны) и, по-видимому, генетической РНК (вирус саркомы Рауса) в генетическую ДНК.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

35-1. Почему А. Корнберг и сотрудники не смогли получить достаточно интенсивного синтеза ДНК в экстрактах клеток, зараженных фагом Т2, к которым были добавлены дезоксиаденозин-, тимидин-, дезоксигуано- и дезоксицитидин-5'-трифосфаты? Как бы Вы поступили, чтобы пошел желаемый синтез?

35-2. Что мы узнали относительно генетического контроля над синтезом нуклеиновых кислот из опытов *in vitro*?

35-3. Как Вы думаете, контролируются ли таутомерные состояния оснований в ДНК генетически? Обоснуйте свое мнение.

35-4. Несмотря на то, что при лабораторном синтезе получается смесь α - и β -конфигураций нуклеозидов (которые различаются по способу взаиморасположения), все нуклеозиды ДНК имеют β -конфигурацию. Как вы можете объяснить этот факт?

35-5. Опишите опыты, проливающие свет на генетику (а) ДНК-полимеразы, (б) РНК-синтетазы, (в) РНК-полимеразы, (г) полинуклеотидфосфорилазы.

35-6. Как Вы думаете, какие биохимические реакции возникли в эволюции первыми: ведущие к синтезу ДНК или РНК? Объясните.

35-7. Многие мутанты ВТМ, индуцированные азотистой кислотой, дают мутантный фенотип, не изменяя последовательность аминокислот в белке оболочки. Каким образом такие мутанты могут давать свойственные им фенотипические эффекты?

35-8. Что говорят нам о происхождении вирусов опыты с метагонами? Объясните.

ЛИТЕРАТУРА

- Бессмен М. Дж. Редупликация ДНК в бесклеточных системах. В сб. «Молекулярная генетика», М., изд-во «Мир», 1964, стр. 9.
- J. Cairns. The chromosome of *Escherichia coli*.— Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1964, 28, 43.
- S. S. Cohen. On Biochemical Variability and Innovation.— Science, 1963, 139, 1017.
- D. B. Ellis and W. Paranchych. Synthesis of Ribonucleic Acid and Protein in Bacteria Infected with an RNA Bacteriophage.— J. Cell. Comp. Physiol., 1963, 62, 207.
- P. Fong. The Replication of the DNA Molecule.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 641.
- I. Gibson and G. H. Beale. The Action of Ribonuclease and 8-Azaguanine on Naze-Killer *Paramecia*.— Genet. Res., 1963, 4, 42.
- I. Gibson and T. M. Sonneborn. Is the Metagon an m-RNA in *Paramecium* and a Virus in *Didinium*? — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 869.
- J. J. Holland. Depression of Host-Controlled RNA Synthesis in Human Cells During Poliovirus Infections.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 23.
- Д. Кернс. Хромосома *Escherichia coli*. Синтез и структура нуклеиновых кислот. М., изд-во «Мир», 1966.
- A. Kornberg. Enzymatic Synthesis of DNA. N. Y. 1962.
- A. Larsson. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides, III. Reduction of Purine Ribonucleotides with an Enzyme System from *Escherichia coli* B.— J. Biol. Chem., 1963, 238, 3414.
- R. Z. Lockhart, Jr. The Necessity for Cellular RNA and Protein Synthesis for Viral Inhibition Resulting from Interferon.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 15, 513.
- K. K. Reddi. Studies on the Formation of Tobacco Mosaic Virus Ribonucleic Acid, III. Utilization of Ribonucleosides of Host Ribonucleic Acid.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 419.
- D. H. Roscoe and R. G. Tucker. The Biosynthesis of a Pyrimidine Replacing Thymine in Bacteriophage.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 16, 106.
- M. Smith. Deoxyribonucleic Acids in Crabs of the Genus *Cancer*.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 67.
- J. G. Stevens and N. B. Groman. A Nucleic Acid Analogue Dependent Animal Virus.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 10, 63.
- I. Takahashi and J. Marmur. Replacement of Thymidylic Acid by Deoxyuridylic Acid in the Deoxyribonucleic Acid of a Transducing Phage for *Bacillus subtilis*.— Nature, 1963, 197, 794.
- H. M. Temin. Homology between RNA from Rous Sarcoma, Virus and DNA from Rous Sarcoma Virus — Infected Cells.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 323.

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ. ОПЕРОНЫ

Всестороннее исследование любого организма показывает, что огромное число самых различных его свойств определяется генетически. Некоторые из них, возможно, представляют собой результаты присутствия или отсутствия генетического материала (например, у парамеции наличие «цитоплазматической ДНК» может определяться присутствием капсидов); другие свойства, вероятно, связаны с изменением локализации генетического материала (например, изменение состояния эписом или инверсия участка хромосомы). Но присутствие, отсутствие или локализация генетического материала ничего не дают для описания механизма, действующего в клетке или в организме, если они подвергаются внешним воздействиям, и не помогают понять, как генетический материал осуществляет свою функцию.

Поэтому мы обратим особое внимание на те возможные свойства, которые представляют собой результат действия генетического материала или в проявлении которых он сам участвует. Самовоспроизведение, являясь тем типичным актом, который определяется генетическим материалом, должно иметь ряд фенотипических последствий, заключающихся в удалении материала — предшественника гена из метаболического фонда и в появлении нового генетического материала. (Генетические механизмы, контролирующие репликацию гена, были рассмотрены в предыдущей главе.) Известно очень много случаев (включая абортную трансдукцию и неделящиеся высоко дифференцированные клетки, например, нейроны), которые доказывают, что ген может действовать, не реплицируясь. Мы уже знаем, что фенотипы всегда зависят от синтеза белка, а для образования информационной РНК необходимо действие генов. Участие ДНК в образовании комплементарной ДНК, т. е. в репликации гена, может препятствовать использованию ее при образовании комплементарной РНК, т. е. участию гена в полипептидном синтезе. Может быть, все так и происходит, даже если ДНК-полимераза использует большой желобок, а РНК-полимераза — малый желобок двуспиральный ДНК. Обнаружение *генов-регуляторов* (например, *активатора* у кукурузы, стр. 398) показало, что действие генов иногда контролируется генетически. Нельзя исключить возможности, что гены в ДНК могут проявлять свои фенотипические эффекты с помощью механизмов, к которым не имеет отношения репликация ДНК и образование информационной РНК.

Действие генов в действительности может контролироваться негенетическим путем. Для образования данного конечного продукта обмена обычно требуется целый ряд ферментативных реакций. Во многих случаях конечный продукт подавляет действие фермента, который одним из первых участвует в этом пути обмена. Такое *ингибирование фермента конечным продуктом*, очень распространенное у бактерий, обеспечивает немедленный и очень точный контроль скорости синтеза многих метаболитов. Ингибирование фермента конечным продуктом представляет собой один из примеров контроля действия гена с помощью механизма *обратной связи*. Возможно, что действие гена может регулироваться более непосредственно — на стадии, предшествующей синтезу белка.

Вспомним (стр. 369), что на участке *Lac* генетической карты *E. coli* находятся три гена, разделяющиеся при рекомбинации. Ген *y⁺* определяет структуру фермента β -галактозид-пермеазы; ген *z⁺* определяет струк-

туру фермента β -галактозидазы (некоторые аллели z приводят к синтезу измененного белка, не обладающего ферментативной активностью, называемого Cz ; этот белок можно идентифицировать по специфическим антигенным свойствам); третий ген, i , определяет синтез вещества репрессора, которое препятствует образованию генами y^+ и z^+ пермеазы и галактозидазы. Однако в присутствии лактозы (она служит субстратом, на который действуют эти ферменты) репрессорное вещество, образуемое геном i , инактивируется, в результате чего становится возможным образование ферментов генами y^+ и z^+ . Лактоза функционирует в качестве индуктора. Поэтому клетка *E. coli*, будучи генотипически $y^+z^+i^+$, не может образовывать пермеазу или галактозидазу конститутивно (в отсутствие лактозы), но синтезирует ее в результате индукции (в присутствии лактозы). Этот пример во многих случаях служит моделью для объяснения генетической природы образования индуцированных ферментов. В этом случае система обратной связи контролирует образование, но не активность определенных ферментов.

Порядок расположения этих генов на карте следующий: *TL... Pro... (Lac) yzi... Ad... Gal*. Заметим, что все три гена области *Lac* действуют на одни и те же вещества. Ген i образует репрессорное вещество, которое в отсутствие лактозы оказывает плеiotропные влияния, т. е. вызывает фенотипическую супрессию обоих генов y^+ и z^+ ; поэтому ген i^+ можно назвать геном-регулятором.

Рассмотрим, каковы последствия некоторых мутаций области *Lac*. Мутанты, способные к конститутивному синтезу пермеазы и галактозидазы, могут иметь генотип y^+z^+i , который не образует специфического репрессора, и гены y^+ и z^+ в этих клетках действуют при всех обстоятельствах. Клетки *E. coli*, гибридные по области *Lac*, можно получить введением в F^- -клетки F -мерогенот, несущих область *Lac* (стр. 369). Таким образом, мы можем получить клетки *E. coli*, у которых хромосома несет гены y^+z^+i (которые сами конститутивно образуют пермеазу и Cz -белок), а *Lac*-частица — гены $y^+z^+i^+$ (которые образуют пермеазу и галактозидазу только после индукции). Гибридные неиндуцированные клетки не образуют этих продуктов (в отсутствие лактозы), хотя все три белка (пермеаза, галактозидаза и Cz -белок) образуются в неиндуцированных бактериях (при контакте с лактозой). Поэтому мы можем заключить, что один ген i может вырабатывать репрессорное вещество, которое подавляет конститутивное, но не индуктивное образование соответствующих продуктов нормальными или мутантными генами y и z , вне зависимости от того, локализованы ли гены в том же самом хромосомном сегменте. Другими словами, вещество-репрессор диффундирует и может действовать на расстоянии. Целый ряд разнообразных данных (А. Герена и М. Отсуйл (1964), М. Бейлиса, Дж. Салсера и А. Элдера (1964) показывает, что репрессор представляет собой белок¹. Аллель гена i^+ , ген i^5 , называемый суперрепрессором, подавляет функцию локусов z и y даже в присутствии лактозы. Очевидно, что вещество суперрепрессора нечувствительно к лактозе, и локусы y и z не могут дерепрессироваться.

Был найден другой мутант, в котором продукты генов y^+ и z^+ образуются конститутивно, что может объясняться мутацией гена i^+ . Будем называть этот мутантный аллель i^x . Если F^- — *Lac*-частицу с генотипом $y^+z^+i^x$ поместить в клетку с хромосомой y^+zi (которая сама по себе образует конститутивно пермеазу и Cz -белок), то в неиндуцированных бактериях Cz -белок не будет образовываться конститутивно. Следовательно, предположение, что i^x есть мутант i^+ , неверно, и i^x должен быть в действительности

¹ Продукт гена i — репрессор *Lac*-оперона удалось выделить в чистом виде и показать, что это белок, обладающий высоким сродством к ДНК *Lac*-области. — Прим. перев.

сти i^- , так как он образует репрессор, способный репрессировать конститутивный синтез Cz -белка. Тогда в чем же заключается мутация частицы $F - Lac$? Предположим, что мутация $F - Lac$ -частицы находится в другом локусе, o^+ . Новый аллель o^c позволяет работать конститутивно только локусам y и z в той же хромосоме (или частице) вне зависимости от того, какой аллель гена i находится в клетке. Предполагая, что это так, и не обращая пока внимания на порядок генов, можно представить генотип $F - Lac$ -частицы как $y^+z^+o^ci^+$, а генотип хромосомы — как y^+zo^+i . Согласно этой новой гипотезе, гибрид должен продуцировать конститутивно пермеазу и галактозидазу и, кроме того, синтезировать Cz -белок при индукции. Так это и оказалось; результаты, полученные в опытах с этим генотипом, а также с гибридами, содержащими аллели o^c и o^+ , суммированы в табл. 36—1. Например, генотип $y^+zo^+i^+/F-Lac\ y^+z^+o^ci^+$ конститутивно образует ферменты y^- и z^- , но не образует вещества Cz , однако в индуцированных клетках синтезируются все три белка. Частичный фенотипический анализ доступен для двух других генотипов. Так, неиндуцированные клетки $yz^+o^+i^+/F-Lac\ y^+zo^ci^-$ продуцируют Cz -белок, но не галактозидазу, хотя оба белка синтезируются после индукции; клетки с генотипом $y^+zo^+i^+/F-Lac\ yz^+o^ci^+$ образуют галактозидазу конститутивно, а галактозидазу и пермеазу — в результате индукции.

Таблица 36—1

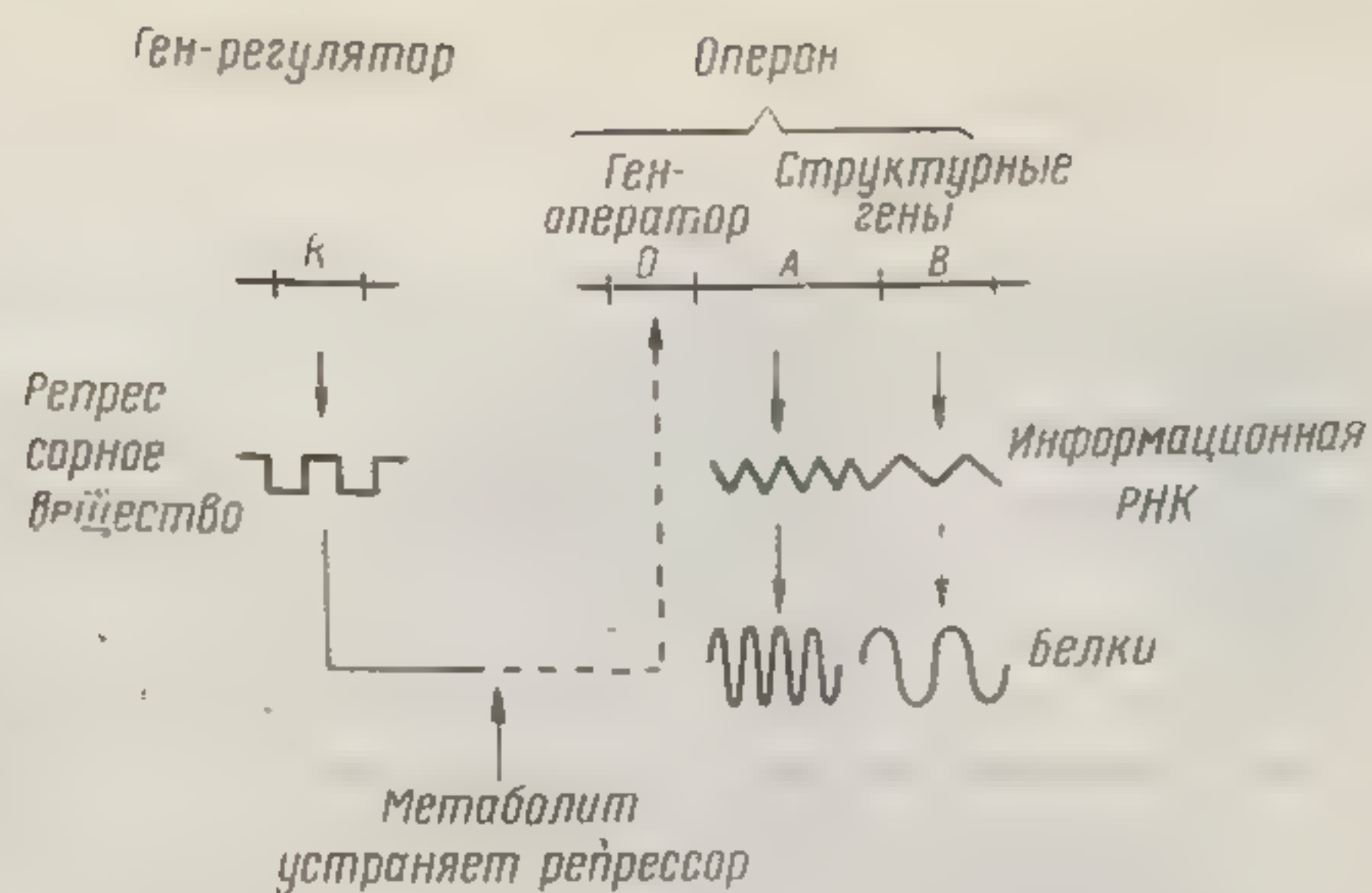
СКРЕЩИВАНИЕ КЛЕТОК *E. coli* И ПРОЯВЛЕНИЕ ОБЛАСТИ *Lac*

| Генотип | | Неиндуцированные бактерии | | | Индукцированные бактерии | | |
|--------------|----------------|---------------------------|----------|---------|--------------------------|----------|---------|
| Хромосома | $F - Lac$ | Π | Γ | $Cz\ B$ | Π | Γ | $Cz\ B$ |
| y^+zo^+i | $y^+z^+o^ci^+$ | 33 | 36 | н | 100 | 270 | 100 |
| $y^+zo^+i^+$ | $y^+z^+o^ci^+$ | 50 | 110 | н | 100 | 330 | 100 |
| $yz^+o^+i^+$ | $y^+zo^ci^+$ | — | <1 | 30 | — | 100 | 400 |
| $y^+zo^+i^+$ | $yz^+o^ci^+$ | н | 60 | — | 100 | 300 | — |

Примечание. (Π) — пермеаза, (Γ) — галактозидаза, ($Cz\ B$) — белок, (н) — не удается определить, (—) не определяли.

Следовательно, результаты этих опытов подтверждают существование гипотетического гена-оператора, o^+ , который чувствителен к репрессору, образуемому геном-регулятором, i^+ . Если образующийся репрессор не инактивируется индуктором (лактозой), то он реагирует с o^+ ; это взаимодействие прекращает функционирование аллелей y и z . При наличии мутантного аллеля i репрессор не образуется, оператор o^+ не затрагивается, и аллели y и z могут работать конститутивно. Однако мутантный аллель o^+ , именно o^c , не чувствителен к репрессору. Следовательно, аллели y и z могут работать конститутивно вне зависимости от того, какой аллель гена i присутствует в генотипе. Заметим, что поведение аллелей y и z зависит от того, какой именно из аллелей o находится в той же хромосоме или в F -частице; другими словами, оно зависит от того, какой аллель o находится вместе с ними в *цис-положении*. Таким образом конститутивный мутант оператора, o^c , обладает плеiotропным влиянием только на гены, находящиеся относительно него в *цис-положении*. Опыты по рекомбинации показывают, что локус o^c находится между генами z и i .

Ген-оператор, по-видимому, не образует специфического продукта, который можно обнаружить в цитоплазме. Поэтому его можно считать геном, основная задача которого заключается в контроле за функционированием других генов, а не в синтезе химического вещества (например, аминокислотной последовательности полипептида). Следовательно, гены-



ФИГ. 36-1.

Взаимосвязь между геном-регулятором, оператором и структурными генами в опероне

операторы можно назвать *функциональными генами* в противоположность *структурным генам*, определяющим химическую структуру (рис. 36-1).

Ген-оператор координирует проявление соседних генов, расположенных в линейном порядке. В нашей модели сходство контролируемых генов состоит в том, что оба структурных гена оказывают влияние на биохимические реакции, участвующие в использовании лактозы. Это позволяет предполагать, что по крайней мере в некоторых случаях можно говорить о функциональной генетической единице с размером, средним между размером гена и хромосомы, которую можно называть *опероном*. Оперон представляет собой ряд линейно расположенных генов, структурная активность которых координируется прилегающим к ним функциональным геном. Обсуждение проблемы оперонов и генов-операторов основано главным образом на работах Жакоба, Перрена, Санчеса и Моно (1960) и Жакоба и Моно (1961). Вероятно, по всей длине оперона синтезируется одна-единственная лента комплементарной информационной РНК; поэтому оперон можно считать единицей транскрипции. Когда функционирует оперон, то образуется лента информационной РНК, содержащая информацию со всех структурных генов оперона. Затем информационная РНК транслируется, начиная с одного конца.

Мутация оператора o^x в лейциновом опероне *Salmonella typhimurium* приводит к возникновению лейцинового ауксотрофа, *leu-500* (F. Mukai, a. P. Margolin, 1963). Прототрофность по лейцину восстанавливается, если с помощью трансдукции ввести оператор дикого типа, o^+ . Если клетки *leu-500* (o^x) поместить в полноценную среду без лейцина, то в результате обратной мутации к o^+ образуются большие колонии. Однако появляются также и мелкие колонии. С помощью теста трансдукции можно доказать, что мелкие колонии имеют общее свойство — все они представляют собой мутанты по одному и тому же локусу — супрессору *leu-500* (*su leu-500*), локализованному вне лейцинового оперона, между триптофановым и цистеиновым оперонами. Мутанты *su leu-500* — это либо точечные мутации, либо делеции; они не полностью супрессируют мутант o^x и, следовательно, прототрофность по лейцину восстанавливается только частично. Нормальный ген-регулятор лейцинового оперона не находится в локусе *su leu-500*; если произошла делеция гена *su leu-500*, то регуляция образования лейцина происходит нормально, т. е. присутствует нормальный лейциновый ген-регулятор. Предполагается, что в норме локус *su leu 500* служит геном-регулятором для одного или нескольких других оперонов. Если в лейциновом опероне находится локус o^+ , то супрессорное вещество, образуемое геном *su leu-500*, не влияет на оперон. Мутация в сторону o^x приводит к тому, что лейциновый оперон становится чувствительным к чужеродному репрессору, образуемому геном *su leu-500*, и репрессор действует здесь как суперрепрессор. Мутация в локусе *su leu-500* частично восстанавливает чувствительность o^x к собственному репрессору; при этом

предполагается, что опероны, которые в норме регулировались геном *su leu-500*, работают конститутивно.

Мутант o^x сначала появился в культуре, обработанной 5-бромурацилом. Его способность к реверсиям на фоне 2-аминопурина убедительно доказывает, что возникновение o^x происходит при замещении одной пары оснований по типу транзиции. Индукция мутаций в локусе *su leu-500* с помощью 2-аминопурина показывает, что простое изменение оснований может изменить природу репрессора *su leu-500*, после чего он перестанет репрессировать оператор. Эти выводы позволяют считать, что:

1) гены-регуляторы для разных оперонов отличаются друг от друга только небольшим числом нуклеотидов в той области, которая ответственна за репрессорное действие на оператор;

2) гены-операторы у разных оперонов отличаются друг от друга относительно небольшим числом нуклеотидов.

Такие опероны, как *Lac*, генетический продукт которых представлен белками, необходимыми для участия в процессах пищеварения, или катаболизма, или для специальных структурных или других биологических целей, в норме часто репрессируются репрессорным веществом, образуемым генами-регуляторами. Чтобы такие опероны начали функционировать, они должны быть дерепрессированы. Однако другие опероны, в особенности те, что образуют ферменты, обычно используемые в обмене веществ, особенно в синтетических и анаболических реакциях, по-видимому, не репрессированы и нормально функционируют. В таких случаях регуляция функции оперона иногда осуществляется репрессором, который образуется, если конечный продукт действия оперона соединяется с продуктом гена-регулятора. Полагают, что существуют и другие механизмы контроля активности оперона, действующие через системы обратной связи.

Мы видим, что на уровне гена любой структурный ген может быть навсегда «выключен» в результате возникшей внутри него мутации. Делеции в таком гене (если они не состоят из трех нуклеотидов или число недостающих нуклеотидов не кратно трем) приводят к выключению других структурных генов оперона, которые транслируются на рибосоме позднее. Мы видели, что функционирование целого оперона может регулироваться или определяться аллелями, находящимися в операторе или в локусах нормального или чуждого регулятора. В принципе такая регуляция оперона может осуществляться на стадии транскрипции или трансляции. Например, замещение основания ДНК у того конца, где начинается синтез информационной РНК, может привести к тому, что этот конец становится чувствительным к собственному или чуждому репрессору, и транскрипция прекращается. У того конца оперона, последовательность которого в информационной РНК считывается первой, может находиться делеция, содержащая число нуклеотидов, не кратное трем. Образующаяся информационная РНК в этом случае была бы целиком бессмысленной. Оперон можно выключить и после образования информационной РНК, если ее подвергнуть перевариванию или заблокировать трансляцию информационной РНК супрессором (E. Orias a. T. Gartner, 1964); выключение оперона может произойти вследствие того, что транслируемые белки не высвобождаются из рибосомы. Регуляция в пределах оперона может идти на стадии трансляции, как показали И. Отака и С. Спигелман, 1963; Б. Эймс и П. Хартман, 1964; см. также ссылки на работы Р. Байрн и соавторов, 1964 (стр. 447) и М. Ниренберга и П. Ледера, 1964 (стр. 461), так как разные белки, закодированные в информационной РНК, образуются в разных количествах.

В некоторых случаях «ген-оператор» может быть ничем иным, как той нуклеотидной последовательностью, с которой начинается ряд структурных генов оперона. Однако остается нерешенным вопрос: что же в инфор-

мацио
полип
бессм
инфор
лекул
подоб

ЗАКЛ

Гены
циона
ние ст
ности
служи
они к
послед
и опер

1)

удаля

2)

3)

шеник

Др

щью р

гулято

станов

Ген

обрат

транск

ВОПРО

36-

одной

информ



ЖАК МОНО
(1964 г.)

мационной РНК является «промежутком», как обозначены конец одного полипептида и начало другого? В этом «промежутке» может находиться бессмысленный триплет или же он может состоять из участка одонитчатой информации РНК, в котором основания спарены в пределах одной молекулы, причем возникает некая вторичная структура («двунитчатая», подобно молекуле sРНК) (М. Singer и др., 1963).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гены в ДНК можно разделить на структурные и функциональные. Функциональным геном называют оператор, который контролирует выражение структурных генов, расположенных рядом в линейной последовательности. Весь этот комплекс генов составляет оперон, который, вероятно, служит единицей транскрипции. Некоторые опероны в норме не работают; они контролируются геном-регулятором, который образует репрессор; последний, в свою очередь, репрессирует оператор, а следовательно и оперон. Дерепрессия таких оперонов достигается с помощью:

- 1) индуктора (обычно это субстрат для первого фермента), который удаляет репрессор;
- 2) мутации гена-регулятора (которая изменяет репрессор);
- 3) мутации оператора (которая делает его нечувствительным по отношению к репрессору).

Другие опероны в норме работают, но могут инактивироваться с помощью репрессоров. Репрессия может быть результатом мутаций генов-регуляторов или генов-операторов, если вследствие мутации ген-оператор становится чувствительным к чужому гену-регулятору.

Гены-регуляторы, индукторы и опероны взаимодействуют в системах обратной связи разных типов как на уровне трансляции, так и на уровне транскрипции, благодаря чему регулируется образование белков.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

36-1. Какие данные Вы можете привести в пользу того, что длины одной ленты информационной РНК достаточно для того, чтобы содержать информацию нескольких структурных генов оперона?

36-2. В каком отношении сходны аллели o^x , o^+ и o^c ? Чем они различаются?

36-3. В чем отличие гена-оператора от гена-регулятора?

36-4. Считаете ли Вы, что нуклеотидная последовательность для гена-оператора длиннее, чем для других генов, образующих оперон? Почему?

36-5. Ведет ли себя профаг так, как будто у него есть один или большее число генов-регуляторов? Ведет ли он себя как репрессированный оперон? Объясните.

36-6. Некоторые исследователи делят гены на три группы: гены для обеспечения структуры; гены для регуляции; гены для приведения гена в действие. Считаете ли Вы, что эта классификация отражает основные различия между генами? Считаете ли Вы, что она полезна? Объясните.

36-7. Какие специфические фенотипические эффекты могут давать опероны у человека?

36-8. Как действуют гены?

36-9. Какова Ваша концепция гена в настоящее время?

36-10. Обсудите тезис, согласно которому делеция 1589 области r II может затрагивать оперон.

36-11. Какие выводы Вы можете сделать из сообщения о том, что на карте сцепления у бактерий одни опероны ориентированы по ходу часовой стрелки, а другие — в противоположном направлении?

36-12. Что Вы можете сказать в поддержку гипотезы, согласно которой мутанты o^c возникли в результате нуклеотидной делеции?

36-13. Примените концепцию оперона к образованию гемоглобина у человека.

36-14. Все ли гены-регуляторы представляют собой гены-супрессоры? Объясните.

ЛИТЕРАТУРА

- J. M. Allen (Ed.). The Molecular Control of Cellular Activity. N. Y., 1961.
- B. N. Ames, P. E. Hartman. The histidine operon.— Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1964, v. 28, p. 349.
- M. E. Balis, J. S. Salser and A. Elder. A Suggested Role for Aminoacids in Deoxyribonucleic Acid.—Nature, 1964, 203, 1170.
- Cellular Regulatory Mechanisms.— Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1952, v. 26.
- J. Gallant and T. Spottswood. Measurement of the Stability of the Repressor of Alkaline Phosphatase Synthesis in *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1591.
- A. Garen and N. Otsuji. Isolation of a Protein Specified by a Regulator Gene.— J. Mol. Biol., 1964, 8, 841.
- L. Gorini. Antagonism between Substrate and Repressor in Controlling the Formation of a Biosynthetic Enzyme.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1960, 46, 682.
- F. Jacob and J. Monod. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins.— J. Mol. Biol., 1961, 3, 318.
- F. Jacob, D. Perrin, C. Sanchez and J. Monod. In: «Papers on Bacterial Genetics», E. A. Adelberg (Ed.). Boston, 1960, p. 395.
- I. Mahler, J. Naumann and J. Marmur. Studies of Genetic Units Controlling Arginine Biosynthesis in *Bacillus subtilis*.— Biochim. et biophys. acta, 1963, 72, 69.
- F. H. Mukai and P. Margolin. Analysis of Unlinked Suppressors of an o^c Mutation in *Salmonella*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 140.
- Y. Ohtaka and S. Spiegelman. Translational Control of Protein Synthesis in a Cell-Free System Directed by a Polycistronic Viral RNA.— Science, 1963, 142, 493.
- E. Orias and T. K. Gartner. Suppression of a Class of rII Mutants of T4 by a Suppressor of a Lac-Operator Negative Mutation.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 859.
- M. Riley and A. B. Pardee. Gene Expression: Its Specificity and Regulation.— Ann. Rev. Microbiol., 1962, 16, 1.
- M. F. Singer, O. W. Jones and M. W. Nirenberg. The Effect of Secondary Structure on the Template Activity of Polyribonucleotides.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 392.
- G. Stent. The Operon: On its Third Anniversary.— Science, 1964, 144, 816.
- P. S. Sypherd and N. Strauss. The Role of RNA in Repression of Enzyme Synthesis.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 1059.

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА —
СИСТЕМЫ ГЕННОГО КОНТРОЛЯ У КУКУРУЗЫ

Обсуждая генетический контроль над мутированием (глава 30), мы рассмотрели случай генов *активатора* и *диссоциации* у кукурузы (стр. 398—399). Оказалось, что управление разрывом хромосомы в системе *Ac* — *Ds* связано с тем, как эта система контролирует функционирование генов, расположенных в цис-положении рядом с *Ds*, а геном *Ds* управляет *Ac*, ген-регулятор. Исходя из того, что мы знаем о системах ген-регулятор — ген-оператор у бактерий, можно постулировать, что *Ds* функционирует как ген-оператор для гена-регулятора *Ac*.

Рассмотрим теперь другой случай¹, который сначала приняли за неустойчивый ген у кукурузы. У зерна кукурузы семя, содержащее зародыш, окружено перикарпом (рис. 2—8). Перикарп образуется родительским поколением, а ткань зародыша — поколением потомства. Бывают растения целиком красные, они образуют красные перикарпы. Другие растения испещрены красными полосами, такая исчерченность проявляется и у перикарпа. Наконец, третьи — целиком некресные. Растения с умеренной красной мозаичностью (названные поэтому *среднемозаичными*) образуют зерна типа показанных на рис. 37—1. В случайно выбранном образце зерна, приведенном на рисунке, около 6% зерен целиком красные. Отсюда (и из других данных) получается, что у родительского растения со среднемозаичным перикарпом мутантными являются около 6% зерен. Генетически это можно приписать мутированию в локусе *P* хромосомы 1. Тогда можно ожидать, что некресные растения должны быть P^wP^w , а растения среднемозаичные, образующие некоторое количество целиком красных зерен, должны быть гетерозиготными по P^w . Другой аллель, P^+ , должен быть неустойчивым и часто мутировать в соматических клетках в ген, вызывающий окрашивание в красный цвет. Если принять эту гипотезу, то большие красные секторы стебля и листьев должны быть вызваны теми мутациями этого неустойчивого аллеля, которые произошли на ранних стадиях развития ростка, а маленькие секторы — мутациями, произошедшими позднее.

Было обнаружено, однако, что среднемозаичные растения дают не только красных, но и слабомозаичных мутантов. На рис. 37—2 можно видеть початки родительского и двух мутантных типов. У *слабомозаичных* зерен (*светлых*) мутантных секторов примерно вдвое меньше, чем у *среднемозаичных* (*средних*).

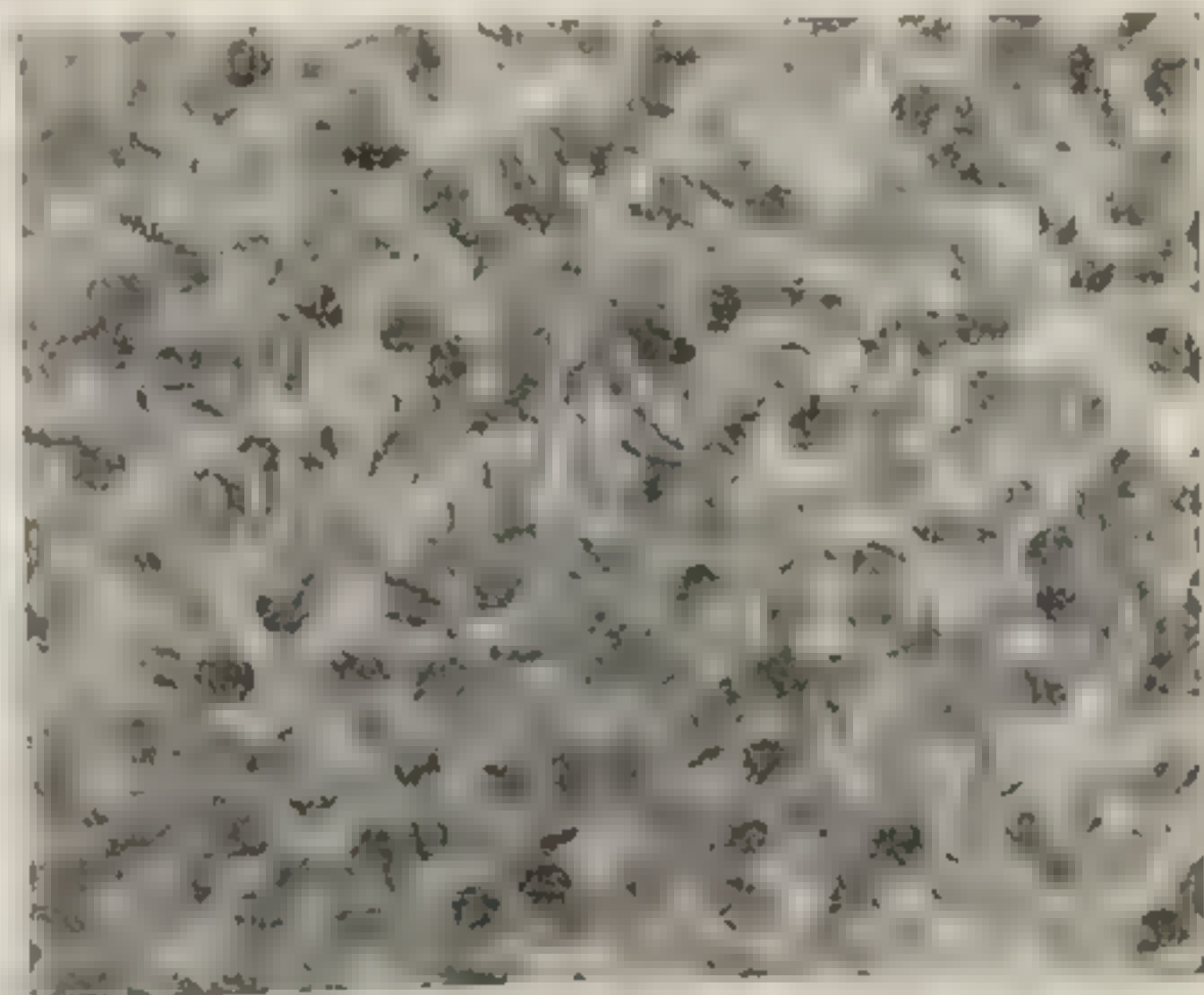


РИС. 37-1.

Образец зерен, выбранных случайным образом из початка со среднемозаичным перикарпом

¹ По работам Р. Бринка с сотрудниками.



РИС. 37-2.

Початки кукурузы со среднемозаичным перикарпом (родительский тип) (А) и мутантные типы — слегка мозаичный (Б) и целиком красный (В)

На рис. 37—3 показаны результаты анализирующего скрещивания средних ($P^v P^w$). Как и следовало ожидать, половина потомства оказалась неокрашенного цвета ($P^w P^w$). Вторая половина была в разной степени окрашенной: 90% — средние ($P^v P^w$), около 6% — *целиком красные* (красные) и 4% — светлые. Сходная частота красных и светлых показывает, что появление этих двух видов мутантов может быть каким-то образом связано друг с другом. При скрещивании красных с $P^w P^w$ получается потомство, которое если вообще окрашено, то целиком красное. Аллель красного цвета в этом скрещивании устойчив.

Изредка мутантные зерна, светлые и красные, появляются в средних початках как близнецовые пятна (рис. 37—4). Это показывает, что красные и светлые не просто связаны по происхождению, но что они комплементарны. Иными словами, при мутировании один из них получает что-то, что другой теряет. В свете результатов, полученных с генами Ac и Ds , для объяснения мозаичности перикарпа можно выдвинуть новую генетическую гипотезу (табл. 37—1). Заметьте, что обозначения генов здесь изменены. Разведение этих линий проводится так, что все мозаичные генотипы гетерозиготны по P^w , устойчивому гену (в хромосоме I) для неокрашенного перикарпа. Принимается, что мозаичный аллель имеет двойную структуру и состоит из P^r , высшего доминантного аллеля красной окраски, и Mr , модулятора, который подавляет образование красного пигмента.

Так как сочетание $P^r Mr$ подавляет красную пигментацию, то получаются средние. Один P^r дает устойчивую темно-красную окраску. $P^r Mr$ вместе с дополнительным Mr где-то в другом месте (*перемещенный модулятор*) дают светлые. Обратимся теперь к результатам, полученным

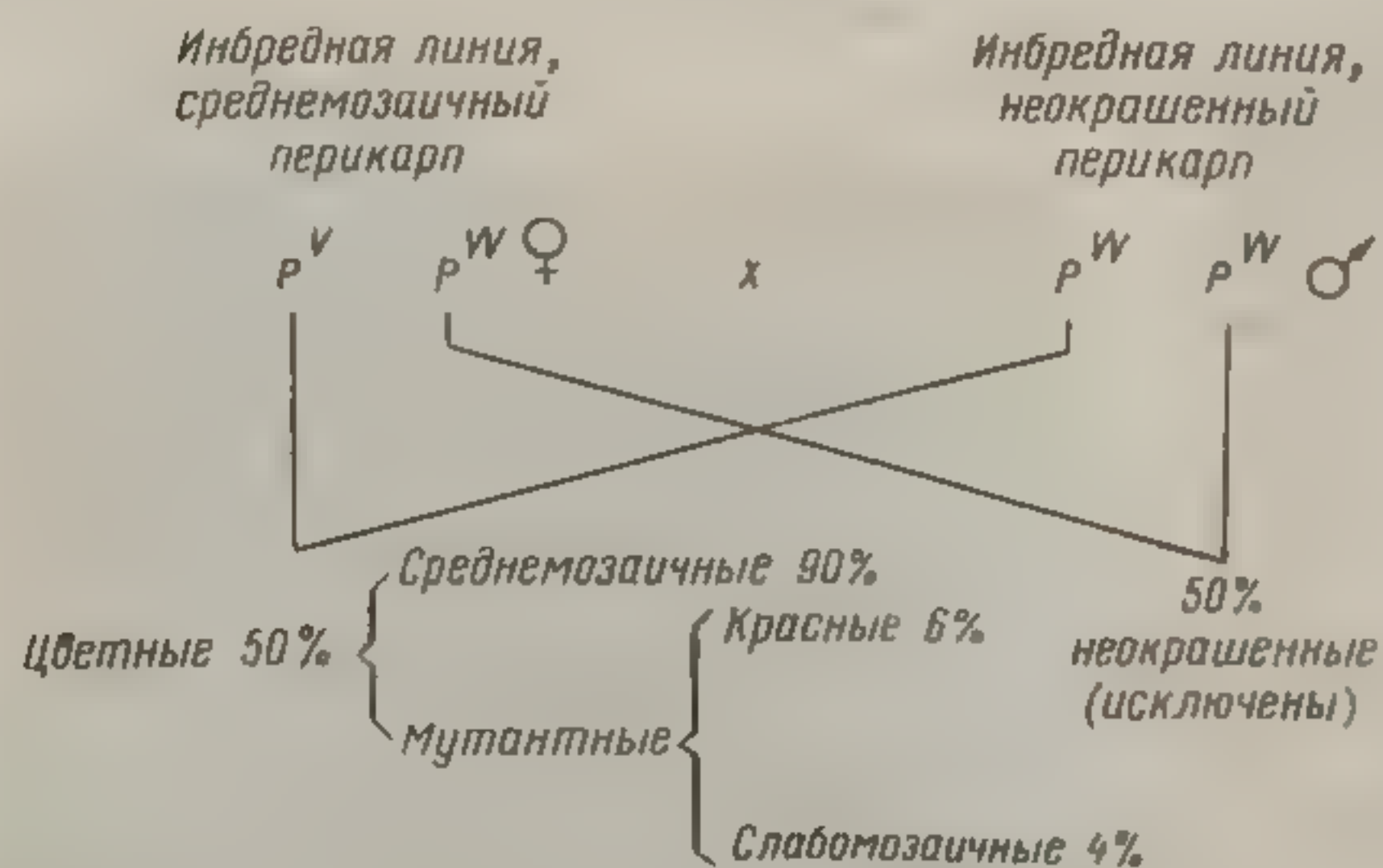
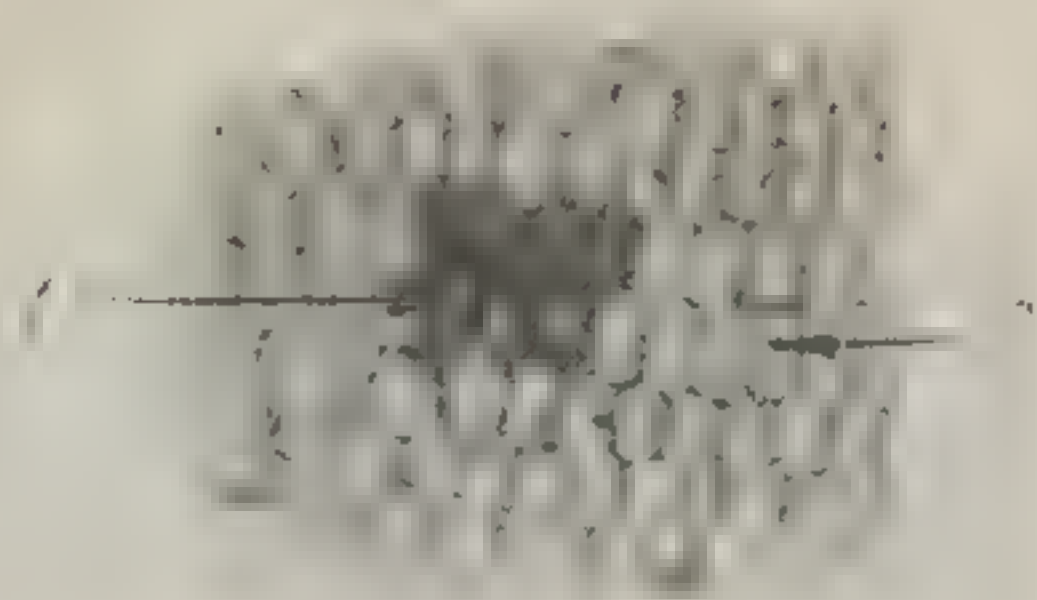


РИС. 37-3.

Результаты скрещивания растений со среднемозаичным перикарпом и с неокрашенным перикарпом

РИС. 37-4.

Близнецовые пятна
мутантных зерен, цели-
ком красных (1) и слегка
мозаичных (2) в початке
со среднемозаичным
перикарпом



при скрещивании светлых ($\overline{P^rMr}/P^w$ плюс перемещенный Mr) с P^rP^w . Половина потомства в этом случае оказывается неокрашенной (P^wP^w). Остальное потомство окрашено — примерно половина из них светлые (генетически подобны светлому родителю), а другую половину составляют среднеокрашенные (как светлый родитель, но без перемещенного Mr) и еще есть немного красных (это те случаи, когда Mr перемещен из $\overline{P^rMr}$, так что P^r оказывается «в одиночестве»). Предполагается, что механизм перемещения Mr из $\overline{P^rMr}$ тот же, что и механизм перемещения Ds . Это

Таблица 37-1

НОВАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГИПОТЕЗА
МОЗАИЧНОСТИ ПЕРИКАРПА

| Фенотип | Генотип |
|---|--|
| Среднемозаичный | $\overline{P^rMr}/P^r$ |
| Мутанты { красный слегка мозаич- ный | p^r/P^w $\overline{P^rMr}/p^w +$ пе- ремещенный $Mr/-$ |

представлено на рис. 37-5, где хромосомы среднеокрашенной родительской клетки ($\overline{P^rMr}$ и P^w) показаны уже поделившимися, но центромеры дочерних нитей все еще сцеплены. При нормальном делении получились бы две

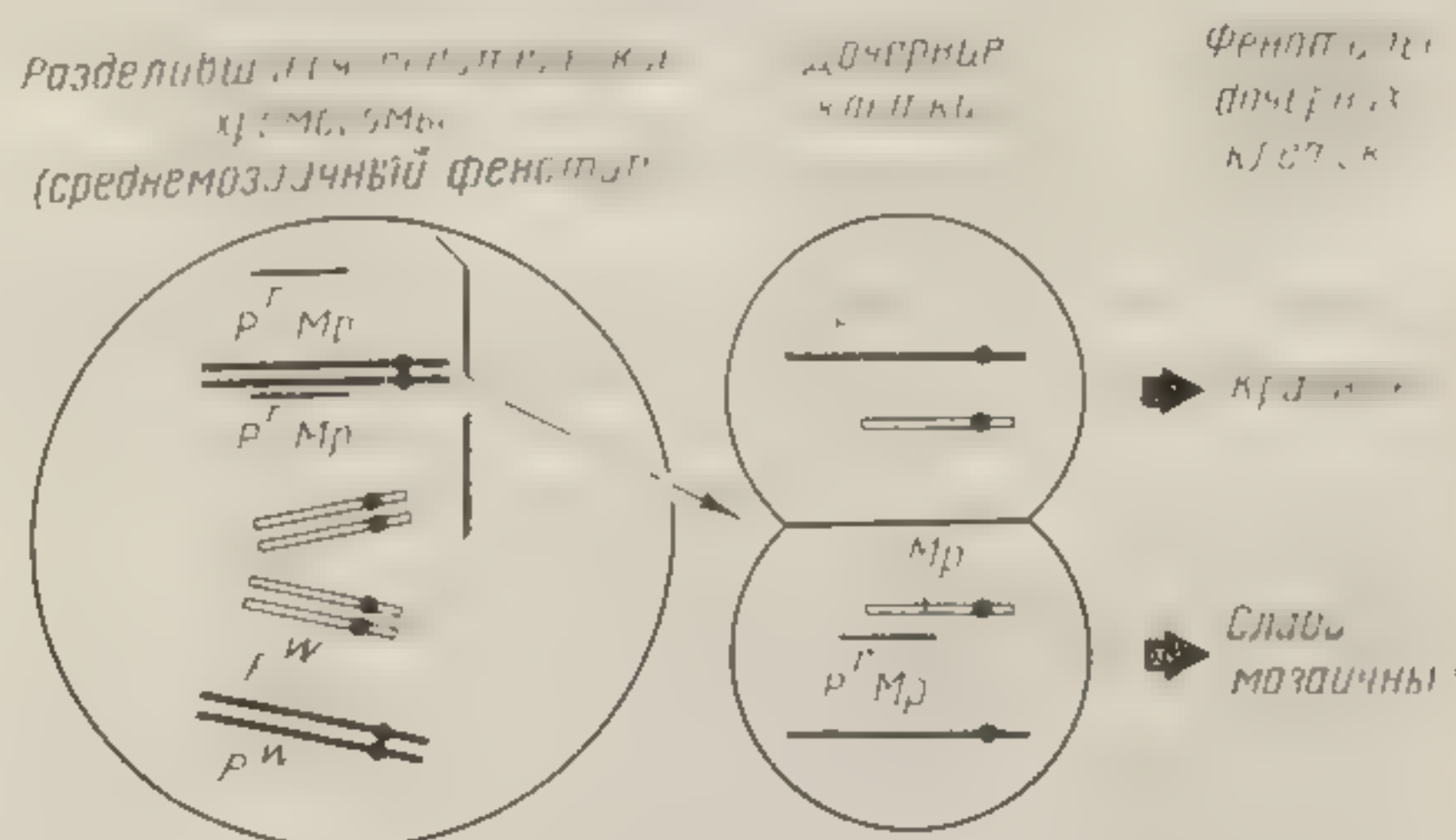


РИС. 37-5.

Перемещение модулятора и происхождение близнецовых секторов

дочерние клетки, каждая из которых несет $\overline{P^rMr}/P^w$ и дает начало сред-неокрашенному сектору. Но если в результате двух или более разрывов или посредством какого-то другого механизма мутирования происходит перемещение Mr (одной из дочерних нитей) в негомологичную хромосому (на рисунке в виде светлой полосы), то может оказаться, что у дочерней клетки, получающей перемещенный Mr , уже есть $\overline{P^rMr}$. В этом случае другая дочерняя клетка будет иметь лишь P^r . В результате последующих обычных митозов клетка, содержащая лишь P^r , даст красные клетки, а сестринская клетка — светлые. Таким образом, эти клетки превращаются в расположенные рядом пятна мутантных клеток на фоне средних клеток (см. рис. 37—4).

Скрещивание $(P^r/P^w \times P^w/P^w)$ должно дать примерно поровну не-красных и красных. Уже отмечалось, что именно так и получается. Зна-чит, у красных нет Mr , который бы находился рядом с P^r . Скрещивание светлых с неокрашенными $(\overline{P^rMr}/P^w$ плюс перемещенный $Mr \times P^w/P^w)$ всегда дает потомство, половина которого неокрашена. Когда перемещен-ный Mr лежит в негомологичной хромосоме, то, как уже отмечалось в предыдущем абзаце, около четверти F_1 будет светлыми, а четверть — сред-ними. Mr может переместиться от $\overline{P^rMr}$, оставаясь все еще в той же хро-мосоме, но на новом месте. Тогда перемещенный Mr у светлых будет нахо-диться в хромосоме I. В этом случае обратное скрещивание даст в F_1 больше четверти светлых и соответственно меньше средних.

Были открыты и другие свойства Mr . Ген Mr может оказаться фикси-рованным в локусе P , так что средние становятся устойчивой неокрасной формой. Перемещенный Mr может занимать разные локусы. Уже отмеча-лось, что эти новые локусы могут быть сцеплены, а могут быть уже и не сцеплены с хромосомой I. Из 87 перемещений Mr в 57 случаях было обна-ружено, что он еще сцеплен с хромосомой I и переместился не далее чем на 50 кроссоверных единиц от P . В остальных 30 случаях Mr оказался перемещенным в какую-либо из пяти негомологичных хромосом. Было показано, что в 37 случаях из тех 57, когда перемещенный Mr все еще был сцеплен с хромосомой I, он находился не далее пяти кроссоверных единиц от P ; в 10 случаях он был расположен на расстояниях от 5 до 15 единиц, а в остальных случаях — еще дальше от P . Следовательно, Mr имеет тенденцию перемещаться скорее на небольшие, чем на значи-тельные расстояния от локуса P . Это показывает, что для сдвигов и пере-мещений Mr необходим, вероятно, контакт между старым и новым его локусом.

Иногда красные растения ревертируют в мозаичные. Обнаружено, что в таких случаях Mr оказывается недалеко от P^r . Можно исследовать частоты таких реверсий от красного типа к мозаичному после внесения в хромосому, содержащую P^r , локуса Mr при разной удаленности его от P^r .

Таблица 37—2

ВЛИЯНИЕ РАССТОЯНИЯ МЕЖДУ Mr
И P НА ЧАСТОТУ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ
 Mr К P

| Процент реком- бинаций $P-Mr$ | Число мозаичных секторов на 1000 зерен |
|----------------------------------|---|
| 2,6 | 15 |
| 4,3 | 11 |
| 7,6 | 8 |
| 12,0 | 3 |
| 42,0 | 0,2 |

Как показано в табл. 37—2, чем ближе к P^r привнесенный Mr , тем выше частота реверсий. Итак, средний тип мутирует в красный при удалении Mr от локуса P^r . При этом получают комплементарные светлые, обладающие лишним Mr — перемещенным Mr . Средний тип восстанавливается при возвращении перемещенного Mr к локусу P^r .

Необходимо сделать два дополнительных замечания. Изменения фенотипа, включающие появление красных, средних, светлых и неокрашенных растений, не вызываются мутациями в локусе P . Эти изменения являются фенотипическими последствиями мутаций, заключающихся в перемещении Mr , и в этом отношении они очень похожи на те изменения, которые происходят вслед за перемещением Ds . Перемещение Mr в другой локус может изменить фенотип, образуемый реципиентным локусом. Например, у одного из среднемозаичных растений с аллелем крахмалистости в хромосоме 9 была обнаружена «мутация» к «восковому» фенотипу. «Восковой» фенотип был неустойчив и часто происходили «мутации» обратно к крахмалистому фенотипу. Исследование этого случая показало, что Mr был перемещен к локусу крахмалистости, который поэтому и дал восковой фенотип. Более того, реверсии к крахмалистости были также результатом перемещения Mr из этого локуса. Все изменения фенотипа, зависящие от присутствия Mr (и Ds), очень похожи на эффект положения.

Пока мы не предлагали доказательств того, что перемещение Mr контролируется генетически. Было обнаружено, однако, что относительная частота перемещения Mr от P^rMr , равная 100 в отсутствие перемещенного Mr , составляет около 60 в присутствии одного перемещенного Mr и около 5, если имеются два перемещенных Mr . Следовательно, перемещение Mr от P^rMr регулируется наличием уже перемещенного Mr .

ТОПОГРАФИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ КОНТРОЛИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Излагаемый в этом разделе материал основан на работах Б. Мак-Клинтон (1961, 1962, 1963).

В системе $Ac - Ds$ ген Ac осуществляет контроль над Ds , не только регулируя его перемещение путем разрыва или с помощью какого-то другого механизма, который может влиять на сцепление, но и другими способами, как это было обнаружено по характеру фенотипического эффекта Ds на находящийся рядом с ним ген. Способностью перемещаться обладают оба гена — и регулятор (Ac) и оператор (Ds), чего не известно для бактериальных систем.

В бактериальных системах гены-регуляторы и операторы могут быть расположены на карте как вблизи, так и на значительных расстояниях друг от друга. Принимая во внимание способность обоих элементов у кукурузы перемещаться, можно высказать гипотезу, что оба эти гена иногда бывают расположены рядом или тесно сцеплены. Следовательно, P^rMr можно толковать как $P^r op^{Mr} R^{Mr}$, где op^{Mr} является геном-оператором, а R^{Mr} — геном-регулятором. В общем, можно предполагать, что если твердо установлено наличие рядом со структурным геном гена-регулятора, то близко к нему расположен и ген-оператор.

Эта общая гипотеза была проверена следующим образом. Ген бронзового цвета, Bz , расположен в хромосоме 9 и имеет полностью рецессивный аллель, bz , который не дает окраски. Если происходит перемещение Ac к Bz и это приводит к мозаичной бронзовой окраске, то следует принять, что теперь этот локус должен быть $Bz op^{Ac} R^{Ac}$. Если в этом локусе действительно существует контролирующая система из двух элементов, то возможны три типа перемещений:

1) перемещение и or^{Ac} , и R^{Ac} (при этом Bz должен освобождаться из-под контроля, а R^A должен оказываться не рядом с Bz);

2) перемещение лишь or^{Ac} (в результате ген Bz также должен высвободиться из-под контроля гена R^A , но последний должен все еще быть около Bz и способен регулировать or^{Ac} , находящийся в других местах генотипа);

3) перемещение лишь R^{Ac} (при этом локус $Bzor^{Ac}$ должен все еще оставаться под контролем R^{Ac} , расположенного на новом месте).

Экспериментальные данные подтверждают эти предположения. Если бы контролирующая система состояла из одного элемента, то не мог бы существовать третий вариант перемещения. Так как результаты других опытов показывают, что R^{Ac} , R^{Mr} и еще другие гены R различны (каждый регулирует свой тип гена or), то, следовательно, у кукурузы встречается много разных систем $or - R$. Способность or перемещаться объясняет, каким образом один or может стать геном-оператором для большого числа локусов, которые раньше этим or не контролировались. Необходима дальнейшая работа с кукурузой, чтобы выяснить:

1) происходит ли при перемещении or или R добавление или замещение уже имеющегося локуса or или R ;

2) как возникают два типа контролирующих локусов и взаимозависимо ли их происхождение;

3) расположены ли два элемента контролирующей системы обычно рядом или они разделены;

4) нуклеотидную основу и биохимическую модель действия контролирующих генных систем $or - R$.

ПАРАМУТИРОВАНИЕ

Локус R в хромосоме 10 кукурузы вызывает образование пигмента антоциана в алейроновом слое и некоторых вегетативных частях растения. В линиях кукурузы из Перу и соседних с ним стран изредка встречаются два аллеля — зернистый, R^{st} , и крапчатый, R^{mb} , которые вызывают пятнистость алейрона. Если у гетерозиготы по одной из этих мутаций другой аллель, R , происходит тоже из одной из этих областей Южной Америки, то они будут иметь ожидаемый фенотип. Растения, гомозиготные по этим мутациям, тоже получают такими, как ожидается. Однако, если в гетерозиготах по таким мутациям другой аллель R происходит из других стран, то получают необычные фенотипы. Это означает, что в популяциях, где встречаются R^{st} и R^{mb} , в результате эволюции возникла такая система контроля, которая не может правильно работать, если эти мутации находятся в гетерозиготном состоянии с чужими для них аллелями R .

Необычный результат для гибридов «чужого R » с R^{st} состоит в том, что пигментация понижена или подавлена в 100% содержащего R потомства, полученного от проверочного скрещивания. Более того, все потомки, содержащие R , продолжают проявлять ту же супрессию пигмента, даже если уже нет больше R^{st} . Поэтому говорят, что R^{st} и R^{mb} парамутагенны. Они вызывают парамутирование чужих аллелей R в парамутантные аллели (R. Brink, 1960). Парамутации могут произойти и в соматической ткани. Фактор R , который становится парамутантным, может сам стать слегка парамутагенным для других аллелей R . Пятнистое окрашивание под действием генов R^{st} и R^{mb} можно отделить от их парамутагенных свойств. Парамутагенное действие R^{st} не исчерпывается повторным выявлением этой функции в растениях RR^{st} . Тем не менее, нет никаких указаний на существование цитоплазматического элемента, выделяемого парамутагенным аллелем и поглощаемого парамутабилильным локусом (R. Brink, J. Kermickle and D. Brown, 1964).

Пар
мутиро
даемое
затрон
вание
матери
шие ис

СУПЕРР

Отдель
развити
сор — м
способа
система
торых к
другие
действие
рование
ного гена
дуемых
эписомам
гой сторо
мепной к
и истории

ЗАКЛЮЧЕ

У кукуруз
ствия гена
ген-регуля
терий. У к



РОЗЛ А. БРИНК
(1961 г.)

Парамутирование может происходить не только у кукурузы. На парамутирование похоже явление условного искажения расщепления, наблюдаемое у дрозофилы (стр. 400—401). Так как считается, что в этом случае затронута система, которая контролирует действие гена, то парамутирование не должно означать изменения химического состава генетического материала. Для выяснения природы парамутирования нужны дальнейшие исследования.

СУПЕРРЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ

Отдельная контролирующая система способна регулировать в процессе развития действие многих генов. Одна из изученных систем (*Spt*, *супресор — мутатор*), по словам Б. Мак-Клинтон (1963), «...служит моделью способа действия одного из типов суперрегуляторного механизма. Такая система может активировать или инактивировать отдельные гены в некоторых клетках в начале развития и активировать или инактивировать другие гены на более поздних стадиях развития. Она может включать действие одних генов в тот же момент, когда она выключает функционирование других. Она может регулировать уровень активности определенного гена в разных частях организма... Контролирующие элементы исследуемых систем могут являться чужими, несущественными, подобными эписомам компонентами, которые включены в геном кукурузы; или, с другой стороны, они могут быть истинно хромосомными компонентами современной кукурузы, каковы бы ни были их эволюционное происхождение и история».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У кукурузы известно много случаев, когда обнаруживается контроль действия гена. Оказалось, что изученные случаи включают несколько систем ген-регулятор — ген-оператор, аналогичных тем, которые найдены у бактерий. У кукурузы оба гена такой контролирующей системы из двух эле-

ментов способны перемещаться в новые локусы. Возможно, что парамутирование затрагивает систему генного контроля. Существуют также и другие, более сложные контролирующие системы (например, суперрегуляторные).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

37.1 Можно ли обнаружить перемещение *модулятора* в локус рядом с P^w ? Объясните.

37.2. Почему слегка мозаичное растение кукурузы с перемещенным *модулятором*, находящимся в той же хромосоме, что и P^rMr , при обратных скрещиваниях этого растения с неокрашенным (P^wP^w) дает среди потомства F_1 более четверти светлых и менее четверти средних?

37.3. Могут ли гены, подобные *модулятору*, приводить к появлению относительно редких «мутантов» аморфного, гипоморфного или неоморфного типов? На чем основано Ваше мнение?

37.4. Подтверждают ли опыты с кукурузой гипотезу, что ген-оператор есть не что иное, как начальный участок нуклеотидной последовательности транскрипционной единицы ДНК? Объясните.

37.5 Является ли парамутирование обычным механизмом регуляции действия гена? Объясните.

37.6. Сравните механизмы контролирования действия генов у кукурузы и у сальмонеллы.

ЛИТЕРАТУРА

- R. A. Brink. Very Light Variegated Pericarp in Maize.—Genetics, 1954, 39, 724.
R. A. Brink. Paramutation and Chromosome Organization.—Quart. Rev. Biol., 1960, 35, 120.
R. A. Brink, J. L. Kermickle and D. F. Brown. Tests for a Gene-Dependent Cytoplasmic Particle Associated with R Paramutation in Maize.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 1067.
B. McClintock. Some Parallels between Gene Control Systems in Maize and Bacteria.—Amer. Nat., 1961, 95, 265.
B. McClintock. Topographical Relations between Elements of Control Systems in Maize.—Carnegie Inst. Wash. Yearb., 1962, 61 (1961—1962), 448.
B. McClintock. Further Studies of Gene-Control Systems in Maize.—Carnegie Inst. Wash. Yearb., 1963, 62 (1962—1963), 486.
N. W. van Schaik and R. A. Brink. Transpositions of Modulator, A Modifier of the Variegated Pericarp Allele in Maize.—Genetics, 1959, 44, 725.

При
ных
в од
заны
насле
тип, с
около
но св
рядом
М
с ним
гие ра
такого
тельно
менно
локуса
являет
может
концов
соедин
эту точ
будучи
скому э
типичес
с ним ге
(стр. 39)
не измен
типичес
перестро
Ген,
навечно
сказывае
разрыва,
простран
непосред
щийся эф
чтобы об
рыве или
Если
эффект по
ген из пер
бывшим р
нировать т
бо облучая
со структу
особи, либ
эффект пол

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА —
ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ У ДРОЗОФИЛЫ

При некоторых индуцированных понижающим излучением хромосомных перестройках у дрозофилы разрывы происходят в одних или почти в одних и тех же точках. Многие из почти идентичных перестроек связаны с одинаковыми изменениями фенотипа. Более того, новый фенотип наследуется всякий раз, когда есть перестройка, и он часто похож на фенотип, образуемый известным аллелем, расположенным в точке разрыва или около нее. Очевидно, в таких случаях изменение фенотипа непосредственно связано с мутацией гена, который расположен в месте разрыва или рядом с ним.

Мы не можем утверждать, что разрыв хромосомы в гене или рядом с ним автоматически переводит его в определенный аллель, так как другие разрывы в этом локусе, приводящие к перестройкам других типов, такого изменения фенотипа не вызывают. По той же причине несостоятельно и предположение, что излучение, вызывающее разрыв, одновременно приводит и к микроделекции или микродупликации поврежденного локуса. Следовательно, важной особенностью этого изменения фенотипа является то, что оно не связано с самим разрывом. Однако изменение может определенным образом зависеть от соединяющихся разорванных концов — оно возникает только когда конец, несущий данный локус, соединяется с концами от определенных локусов генома. Если принять эту точку зрения, то следует ожидать, что ген у разорванного конца, будучи соединенным с одними концами, приведет к одному фенотипическому эффекту, а с другими концами — к другому. Иными словами, фенотипический эффект гена может изменяться в зависимости от соседних с ним генов. Такое изменение фенотипа было названо *эффектом положения* (стр. 398—400). По-видимому, эффект положения изменяет действие гена, не изменяя сам ген. Поэтому эффект положения может быть одним из фенотипических последствий мутаций, при которых происходят структурные перестройки, хотя сам по себе он не является мутацией.

Ген, проявляющий эффект положения, вероятно, никак не изменен навечно ни химически, ни физически. Так как иногда эффект положения сказывается и на генах, находящихся на некотором расстоянии от места разрыва, то эффект положения, очевидно, может каким-то образом распространяться вдоль хромосомы и влиять на функционирование генов, непосредственные соседи которых не заменились. Этот *распространяющийся эффект* является дополнительной причиной для отказа от того, чтобы объяснять эффект положения, основываясь исключительно на разрыве или другом мутационном изменении, связанном с понижением.

Если не изменяется физико-химическая основа гена, проявляющего эффект положения, то можно предсказать следующее. Во-первых, если ген из перестройки, дающей эффект положения, перевести обратно к генам, бывшим ранее его соседями по хромосоме, то он должен начать функционировать также, как и раньше. Это можно проверить экспериментально, либо облучая особи с перестроенными хромосомами и исследуя потомство со структурными перестройками, обратными перестройке у облучаемой особи, либо перемещая (посредством кроссинговера) ген, показывающий эффект положения, в нормальную хромосому. В обоих случаях было обна-

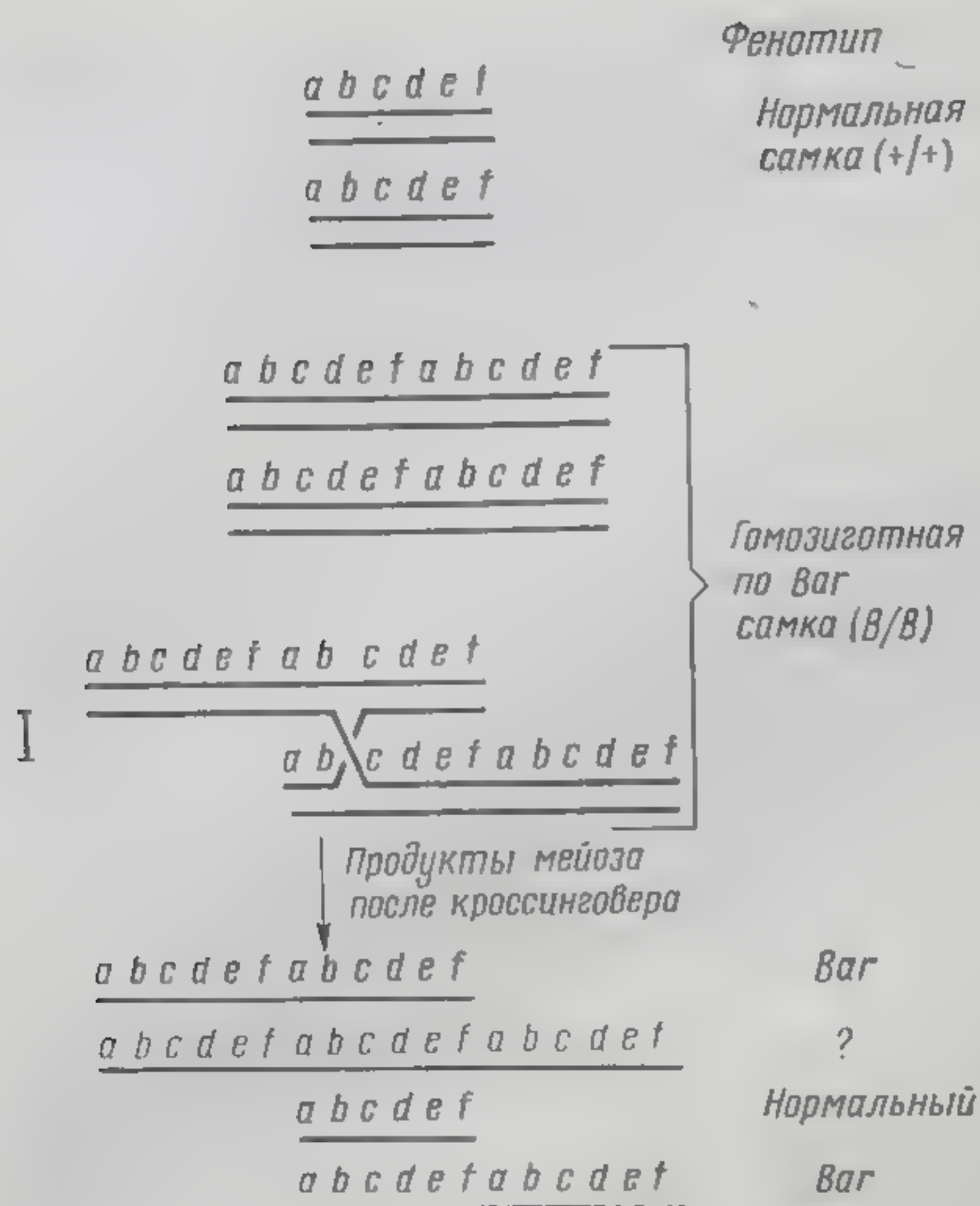


РИС. 38-1.

Схема нормального участка и участка Bar X-хромосомы и результаты перекреста после конъюгации «наискосок» (I).

ружено, что ген возвращается к своему исходному положению и исходному фенотипическому эффекту. Второе предсказание заключается в том, что нормальный ген, если его поместить посредством перекреста в перестройку, должен проявить эффект положения. Это действительно и происходит.

У дрозофилы эффект положения часто сопровождается те перестройки, при которых гены, локализованные в эухроматине, перемещаются к гетерохроматиновым участкам. Перенос гена, обычно находящегося в эухроматиновом участке, в гетерохроматин или участок рядом с ним часто приводит к особому, колеблющемуся эффекту положения, который проявляется в мозаичном или вариегирующем фенотипе. Так, например, если ген w^+ красного цвета глаз, расположенный в X-хромосоме (обычно в эухроматине), перенести посредством парацентрической инверсии в гетерохроматин около центромера, то в результате возникает окраска глаз типа mottled (крапчатые с белыми и красными пятнышками). Однако такая мозаичность уменьшается, если к генотипу в результате скрещивания добавляется лишняя Y-хромосома или какая-нибудь другая хромосома, богатая гетерохроматином. Пока не совсем ясно, как получается такое подавление мозаичности.

Единственным условием возникновения эффекта положения является соответствующая замена соседних генов. Разрыв лишь представляет возможность получения таких изменений. К эффекту положения должны привести и другие механизмы изменения относительного расположения генов, например, перекрест. Посмотрим, можно ли придумать такую кроссоверную систему, которая дала бы эффект положения. (Последующее изложение основано на результатах исследований А. Стертеванта, Г. Меллера, К. Бриджеса и др.).

Мутация Bar (B) у дрозофилы, сцепленная с X, уменьшает число *фасеток* (омматидий) в сложном глазе, так что нормально круглый глаз становится полосковидным. Когда в ядрах слюнных желез личинок исследовали нормальные хромосомы и хромосомы, несущие Bar, то было обнаружено, что примерно семь дисков, лежащих подряд в нормальной

хромосоме, оказались в хромосоме Bar tandemно дублированными. Обозначим один такой участок как *abcdef*. Соответственно, нормальная самка содержит *abcdef/abcdef*, а самка, гомозиготная по Bar, — *abcdef/abcdef* *abcdef*. У нормальных самок (+/+) конъюгируют гомологичные буквы (участки) двух гомологичных хромосом, и перекрест происходит между соответствующими буквами. В самках, гомозиготных по Bar (*B/B*), тоже может происходить точный синапсис и нормальный перекрест. Но в этом случае возможна и другая последовательность событий, что может привести к неправильной конъюгации — левый участок одной хромосомы может спариться с правым участком другой хромосомы (рис. 38—1), так что два других участка оказываются неспаренными. Если за таким синапсисом наискосок следует нормальный перекрест где-то в области конъюгации (как показанный на рисунке перекрест между *b* и *c*), то кроссоверные нити окажутся *abcdef* и *abcdef* *abcdef* *abcdef*. У первой нити этот участок есть только в одном варианте и потому она будет нормальной (+), а у второй этот участок утроен. Если яйцо, содержащее кроссовер с одним участком, оплодотворяется несущим X-хромосому спермием самца с глазами нормальной формы, то из такой зиготы получится самка с нормальными глазами, что показывает, что в этом случае произошла реверсия Bar к +. Этот результат можно проверить на следующем поколении, исследуя хромосомы слюнных желез.

Если таким же спермием оплодотворяется яйцо, содержащее кроссовер с утроенным участком, то получится самка с четырьмя такими участками, тремя в одной хромосоме и одним — в гомологичной. Каков должен быть фенотип такой самки? Будет ли какая-нибудь разница в фенотипе, когда эти участки группируются по два (как у гомозигот по Bar) и когда они образуют группы — три и один? Заметим, что соседние гены различны в случае, когда в каждом из гомологов имеется по два участка, и в случае, когда в одном из гомологов находится три участка, а в другом — лишь один. Так как существует эффект положения, то это различие в соседях может привести к разным фенотипам.

Поскольку мы не знаем, каков должен быть фенотип в результате возможного эффекта положения, то будем наблюдать за любыми существенными отклонениями от ожидаемого числа фасеток в глазе. Нормальные округлые глаза самок и самцов (+, + и +/Y) состоят более чем из 200 фасеток. Глаза гомозиготных по Bar самок (*B/B*) и гемизиготных по Bar самцов (*B/Y*) состоят примерно из 68 омматидий каждый. В глазах гетерозиготных самок (+/B) около 150 фасеток. Следовательно, Bar в одной хромосоме не полностью доминирует над + в гомологичной. При скрещивании +, Y♂ с *B/B*♀ типичные самки *F*₁ являются +/B и их глаза содержат примерно по 150 омматидий. Как уже указывалось, реверсии к состоянию + в результате перекреста в конъюгированной наискосок тетраде могут быть выявлены как самки —/+. Комплементарный кроссовер — хромосома с утроенной областью — вместе с нормальной хромосомой должны дать самку, глаза которой могли бы иметь как меньше, так и больше 68 фасеток, но меньше 150 фасеток.

Однако план постановки опыта разработан еще не до конца. Поскольку мы не знаем, как часто будут получаться при мейозе хромосомы, дающие предполагаемый эффект положения, то нужно исключить две другие возможные причины появления глаз необычной формы. Если проводить скрещивание +/Y с *B/B*, то при оплодотворении яйца без X-хромосомы (получившегося в результате нерасхождения у матери) спермием с двумя X-хромосомами (из-за нерасхождения у отца) получится самка +/+, которая будет относиться к одному из необычных типов. Хотя такие зиготы и должны быть крайне редкими, их можно узнать, если хромосома + содержит в качестве маркера ген желтой окраски тела, *y*. У таких дочерей, возникших в результате нерасхождений, тело должно быть окраше-

но в желтый, а не в серый, цвет. (Таким способом мы можем также опознать в потомстве самок, получившихся из-за загрязнения культуры мухами желтой линии.) Следовательно, мы должны провести скрещивание $y - \frac{B}{Y}$ с y^+B, y^+B . Для ясности мы ввели обозначение $\frac{+}{B}$ для гена округлой формы глаз.

Чтобы в результатах не было путаницы, нужно еще отсеять мутации в локусе B или вблизи него. Искомые необычные фенотипы (округлые глаза и глаза неизвестной нам формы) должны получаться всегда после перекреста в области Var . Можно получить самку B/B , дигибридную по генам, расположенным с обеих сторон от B , причем расположенных так близко к B (на расстояниях, меньших десяти кроссоверных единиц), чтобы были исключены двойные кроссоверы между ними. На карте сцепления X-хромосомы Var расположен в 57,0, *вилчатые щетинки* (forked bristles) (f) — в 56,7, а *темно-рубиновый цвет глаз* (carnation) (car) — в 62,5. Поэтому нужно иметь самок: $y^+f^+B car/y^+fB car^+$. Теперь мы можем не учитывать в дальнейшем мух с глазами любой необычной формы, которые не являются кроссоверами между локусами f и car . Все интересующие нас необычные фенотипы должны быть у кроссоверов между f и car . Обычно кроссоверы в этой области должны встречаться у 5,8% (62,5 минус 56,7) дочерей F_1 . Чтобы выявить кроссоверных дочерей (которые будут либо с нормальными щетинками и глазами обычного цвета, либо с вилчатыми щетинками и рубиновыми глазами), нужно использовать самцов $yf \frac{+}{B} car/Y$. Поэтому проводится такое скрещивание:

$$yf \frac{+}{B} car/Y \text{ ♂} \times y^+f^+B car/y^+fB car^+ \text{ ♀}.$$

Когда этот опыт был проведен, то оказалось, что примерно одна из 2000 дочерей имела округлые глаза и содержала кроссовер между f и car . Примерно такой же процент кроссоверных дочерей имел очень узкие глаза, названные *UltraVar* (рис. 38—2); каждый такой глаз состоял примерно из 45 фасеток. Оба типа необычных мух встречались с равной частотой, как и ожидается для реципрокных продуктов предполагаемого перекреста. Кроме того, самки *UltraVar*, как это было предсказано и как выяснилось при изучении слюнных желез их F_1 , содержат утроенный участок в одной X-хромосоме и один участок в другой. Любое возражение, что фенотип *UltraVar* получается не из-за эффекта положения, а в результате мутации, т. е. каким-то образом зависит от происходящего одновременно перекреста, отменяется, так как получают самки, содержащие оба необычных типа X-хромосом, и в их потомстве изредка обнаруживаются совершенно обычные хромосомы Var . Доказано, что эти хромосомы Var являются результатом перекреста между единичной областью одной хромосомы и средним участком ее в гомологе с утроенной дозой (рис. 38—3).

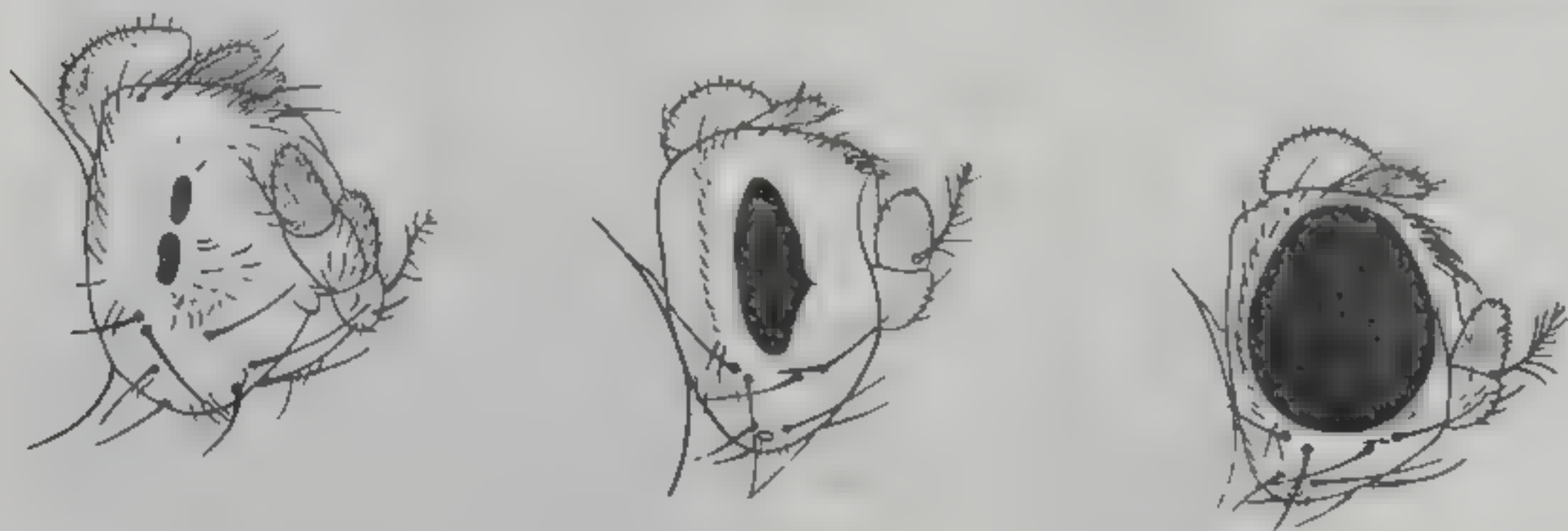


РИС. 38-2.

Сложный глаз дрозофилы. Слева: *UltraVar*, в центре: *Var*, справа: нормальный

Отсюда можно сделать вывод, что четыре участка, расположенные разными способами (причем это является результатом перекреста, а не разрывов хромосомы, вызывающих мутации), приводят к разным фенотипам.

Из хромосомы *B* (удвоенный участок) может получиться небольшое количество хромосом, нерекombинантных по пограничным маркерам, но тем не менее представляющих собой тип $+$ (единичный участок) или *Ultrabar* (утроенный участок). Такое необычное положение является результатом внутрихромосомного обмена внутри двойной петли, которая образуется, если две области тандемно дублированного участка конъюгируют друг с другом. Точно так же внутрихромосомный обмен внутри хромосомы *Ultrabar* может дать хромосомы $+$ и *B* (H. Peterson а. J. Laughnan, 1963).

Возможен и другой способ обнаружения эффектов положения с помощью перекреста. У самки дрозофилы с генотипом $y^+ b^+ spl^- / y^- a b^+ spl^+$ и локус *a*, и локус *b* гетерозиготны, причем мутации находятся в разных гомологах, т. е. в *транс*-положении (рис. 38—4). Если между этими локусами происходит перекрест, то получающиеся в результате кроссоверные хромосомы оказываются $y^+ a^+ b^+ spl^+$ и $y^- a b spl^-$. Когда обе эти кроссоверные хромосомы находятся у одной и той же особи, то обе мутации (*a* и *b*) оказываются в одном и том же гомологе, т. е. в *цис*-положении. У *цис*- и *транс*-гетерозигот одинаковое количество локусов в каждой хромосоме. Однако в первом случае соседями являются *a* и *b*⁺ (и *a*⁺ и *b*), а во втором случае — *a* и *b* (и *a*⁺ и *b*⁺). Если у *транс*-диггибрида отмечен некий фенотип, то у полученного из него в результате перекреста *цис*-диггибрида фенотип уже другой. Далее, если посредством перекреста *цис*-форму перевести обратно в *транс*-форму и при этом восстановить старый фенотип, то эффект положения можно считать доказанным.

Наибольшая вероятность получить положительный результат с помощью такого *цис-транс* теста на эффект положения имеется в тех случаях, когда две пары вовлеченных генов являются соседями или расположены очень близко друг от друга. Но если гены расположены очень близко друг к другу, то перекрест между ними будет происходить очень редко и нужно исследовать большое количество потомков, чтобы быть уверенным, что встретится хотя бы один кроссовер.

Все члены серии множественных аллелей в локусе *white* X-хромосомы дрозофилы расположены на кроссоверной карте примерно в точке 1,5. Хотя у гибрида $w^a w$, несущего w^a (*apricot* —

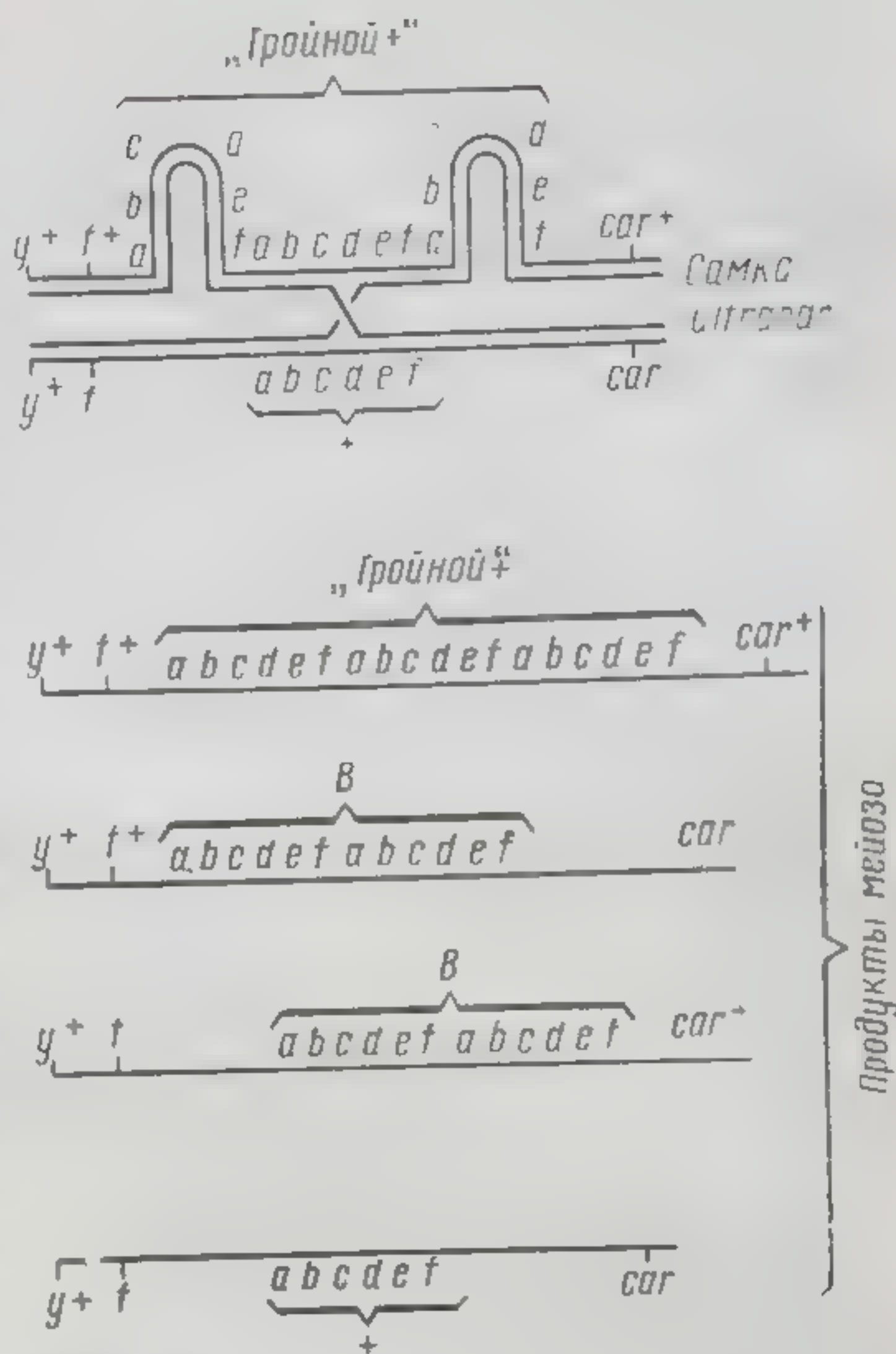


РИС. 38-3.

Образование хромосом *Bar* при перекресте у самок *Ultrabar*

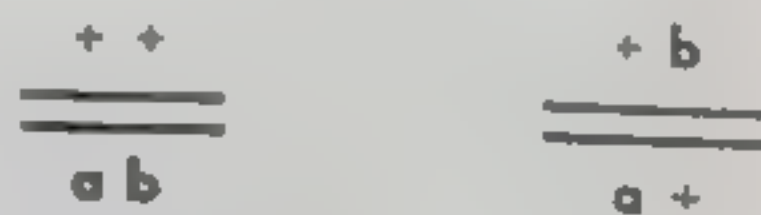


РИС. 38-4.

Цис- (слева) и *транс*- (справа) положения дигибридных сцеплений генов

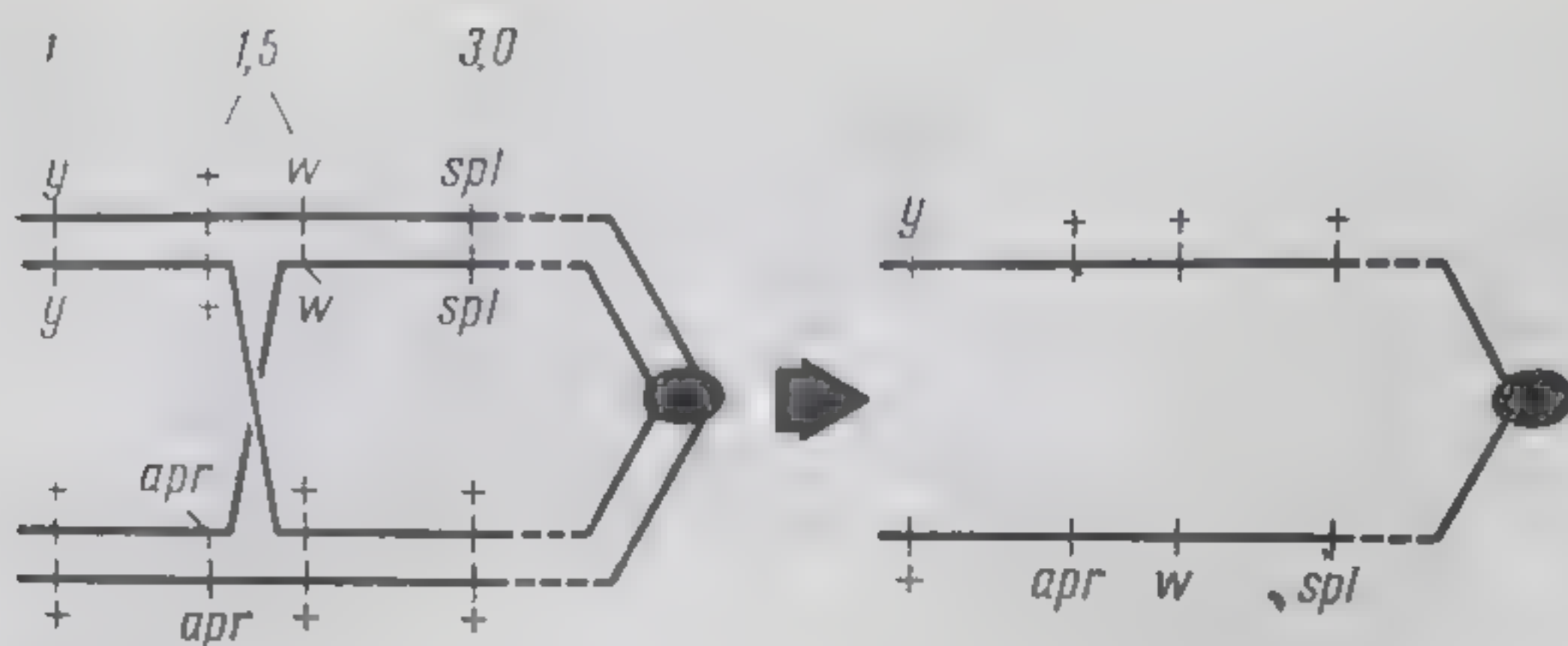


РИС. 38-5.

Перекрест между apricot и white в сцепленных X-хромосомах

абрикосовый цвет глаз) и w (white — белые глаза), глаза оказываются бледно-абрикосового цвета, это еще не доказывает, что w^a и w представляют собой альтернативные состояния одного и того же гена. Допустим, что w^a и w являются на самом деле мутациями двух разных генов с похожим действием, которые расположены недалеко друг от друга, один в 1,49 (w^{a+}), а другой в 1,51 (w^+). На основании ограниченных и несколько варьирующих данных о перскрестах их обоих могли случайно поместить в один и тот же локус 1,5. Если w^{a+} и w^+ действительно расположены рядом, но являются разными локусами, то транс-дигибрид может в результате перекреста дать цис-дигибрид.

Чтобы проверить, являются ли w^{a+} и w^+ разными локусами, Е. Льюис разводил самок дрозофилы со сцепленными X-хромосомами, где в одном плече было $y w spl$, а в другом плече — $y^+ w^a spl^+$. Вспомним, что использование сцепленных X-хромосом позволяет сохранить две из четырех нитей, участвующих в каждом перекресте (стр. 132—133). При генетической системе со сцепленными X-хромосомами иногда в одной гамете появляются оба комплементарных кроссоверных типа. На рис. 38—5 (слева) схематически показана часть этой сцепленной X-хромосомы в том виде, как она должна появиться на стадии тетрады во время перекреста, и указано обычное расположение маркеров y и spl на генетической карте. Когда самки с глазами бледно-абрикосового цвета и такой хромосомой скрещиваются с самцом, несущим Bar, то обычно самки из F_1 , не содержащие Bar (которые от отца получили Y-хромосому), некроссоверны и у них глаза, как и у матери, бледно-абрикосового цвета. В результате перекрестов между областью, содержащей локус white, и центромером получают дочери либо с белыми, либо с абрикосовыми глазами. Это единственные фенотипы, которых следует ожидать, пренебрегая возможностью мутаций, если w^a и w являются альтернативными состояниями одного и того же гена.

Но если w^{a+} отделен от w^+ , то ему следует дать новое обозначение $apricot^+$. Если $apricot^+$ расположен слева от w^+ (как показано в левой части рисунка), то и у $apricot^+$, и у w в другом плече родительской сцепленной X-хромосомы должны быть собственные аллели + и, следовательно, мать должна быть по этим локусам транс-гетерозиготной. Редкие перекресты между этими локусами должны дать кроссоверную сцепленную X-хромосому, показанную на рисунке справа. В результате перекреста обе мутации должны оказаться в цис-положении.

При обследовании большого количества дочерей самок со сцепленными X-хромосомами оказалось, что у нескольких из них глаза красные. Очень важно было определить, являются ли эти мухи мутантами или они появились в результате перехода из транс-формы в цис-форму. Для этого у редких мух с красными глазами разъединяли сцепленные X-хромосомы, т. е. разделяли плечи (накопляя продукты редких перекрестов, про-

исходящих между сцепленной X- и Y-хромосомами в гетерохроматиновых участках вблизи центромеров). Затем определяли, какие гены находятся в каждом из разъединенных плеч. В результате было обнаружено, что одно плечо всегда может быть представлено как $y\ apr\ w\ spl$, а другое плечо — как $y^+ apr\ w\ spl$. Это подтверждает представление, что необычные самки с красными глазами были цис-гетерозиготными и что *apr* расположен на X-хромосоме слева от *w*, как и показано на рисунке. (Полезно нарисовать расположение маркеров после перекреста между *apr* и *w*, исходя из предположения, что *apr* находится справа от *w*.)

Доказательство того, что необычные самки с красными глазами являются результатом эффекта положения, а не мутации, было получено при скрещивании этих необычных самок, когда изредка появлялись дочери с глазами бледно-абрикосового цвета. Оказалось, что у этих новых необычных дочерей в результате перекреста восстановлено исходное расположение генов.

Фенотипическое различие между бледно-абрикосовыми и красными, несомненно, является результатом эффекта положения, так как единственное различие между цис- и транс-состояниями заключается в расположении генетического материала. Поэтому это явление было названо *цис-транс-эффектом положения*. Чтобы обнаружить такой эффект, нужно разделить два очень тесно сцепленных гена. До этого эксперимента использовавшиеся в нем гены считались аллелями, так как они расположены на генетической карте рядом и обладают сходными фенотипическими эффектами. Обнаружение же у них цис-транс-эффекта положения показывает, что они не аллельны и занимают разные локусы. Когда были исследованы другие гены, входящие в «серию множественных аллелей white» (глава 5), то оказалось, что некоторые из них аллельны *w*, а другие аллельны *apr*. Однако некоторые оказались не аллельными ни тому, ни другому и изучение соответствующих перекрестов показало, что «область white» X-хромосомы представляет собой скопление пяти (а может быть и более) отдельных, линейно расположенных генов со сходным действием.

Теперь известны и другие области в геноме, для которых доказано, что два или более альтернативных состояния гена, ранее считавшиеся аллелями, на самом деле являются *псевдоаллелями*. Это было доказано, когда они были подвергнуты цис-транс-тесту. Случаи псевдоаллелизма обнаружены у *Aspergillus*, у других микроорганизмов, у кукурузы. С псевдоаллелизмом связана окраска хлопчатника, бесхвостость у мышей, ромбовидные (*lozenge*) и киноварные (*vermillion*) глаза у дрозофилы.

Другой случай псевдоаллелизма у дрозофилы¹ включает неаллельные гены, функции которых различаются несколько сильнее, чем функции *apr* и *w*. У обычной мухи дикого типа (рис. 38—6, А) на задней части груди расположены небольшие, утолщенные на конце *жуужжальца*. Один из псевдоаллелей *bithorax* (удвоение груди) — *bx* — переводит жуужжальце в большую, похожую на крыло структуру (рис. 38—6, Б). На первый взгляд кажется, что другой псевдоаллель, названный *postbithorax* (*pbx*), дает тот же, но только сильнее выраженный эффект (рис. 38—6, В). Но если приглядеться повнимательнее, то на самом деле эти два рецессивных псевдоаллеля имеют разные функции. *Bithorax* превращает в похожую на крыло структуру переднюю часть жуужжальца, а *postbithorax* — заднюю часть его. У мух, гомозиготных по обеим этим мутациям, такие изменения приводят к появлению полностью развитой второй пары крыльев (рис. 38—6, Г).

Каковы цис-транс-эффекты для *bx* и *pbx*? У цис-формы (+ + / *bx pbx*) жуужжальца обычные, а у транс-формы (*bx* + / + *pbx*) наблюдается слабый эффект *postbithorax*. Мы видим здесь другой пример цис-транс-эффекта

¹ Подробнее см. E. W. Lewis. *Genes and Developmental Pathways*. «Amer. Zool.», 1963, т. 3, 33—56.



РИС. 38-6.

Самцы *Drosophila melanogaster*: нормальный (A), bithorax (B), postbithorax (B) и bithorax postbithorax (I)

положения и показывает неаллельность этих генов. Расстояние на карте между этими локусами равно 0,02.

Эти примеры псевдоаллелизма затрагивают, по-видимому, отдельные, но тесно сцепленные функциональные гены. Не похоже, чтобы они включали внутригенную рекомбинацию типа той, которая происходит внутри цистрона A или B области r II ф T4. Однако существует возможность, что у дрозофилы может происходить рекомбинация не только между функциональными генными единицами, но и внутри них (W. Welshons and E. Von Halle, 1962; A. Chovnick, A. Schalet, R. Kernaghan and M. Krauss, 1964), хотя в этом могут участвовать и другие механизмы, отличные от перекреста.

Рассмотрим теперь морфологию участков хромосом дрозофилы, содержащих псевдоаллели. Серия white связана с двойным диском (дублетом) в хромосоме слюнной железы. Возможно, что *arg* находится в одном диске, а *u* — в другом. Серия vermillion связана с другим дублетом в X-хромосоме, а серия bithorax (состоящая из пяти отдельных псевдоаллельных локусов) связана с двумя дублетами. (Последнее показывает, что диск может содержать больше одного отдельного гена, что доказывается также и другими данными.) Наличие в хромосомах слюнных желез большого количества дублетов указывает на то, что гены, расположенные в этих участках, являются псевдоаллельными.

Можно несколькими способами объяснять возникновение соседних локусов с близкими типами действия. Одно из объяснений состоит в том, что соседние гены, дающие разные эффекты, во время эволюции мутировали в аллели, выполняющие сходные, предположительно полезные функции. Второе возможное объяснение сводится к тому, что перестройки связали вместе неаллельные гены со сходными функциями, которые до

этого находились далеко друг от друга. Хотя для некоторых из обнаруженных случаев обоих этих объяснений и может быть достаточно, однако более вероятно, что большинство соседних и сходных по действию генов появилось в результате одной или нескольких (как в случае серии *bithogax*) дупликаций, о способе возникновения которых уже шла речь в главе 12 (см. также стр. 431—433). После дупликации исходно идентичные гены, расположенные рядом, могли в результате мутирования начать как-то функционально различаться.

Что вызывает эффекты положения? Наиболее вероятно, что действие генов, являющихся соседями, зависит в большей степени от них самих, чем от их аллелей в гомологичной хромосоме (которые обычно находятся на значительном расстоянии от них). Такая зависимость может быть причиной эффекта положения, когда при разрыве изменены относительные расположения гетерохроматина и эухроматина. Эффекты положения, вызванные структурными изменениями, могут быть особенно распространены у видов, у которых хромосомы или участки хромосом занимают в ядре определенные положения друг относительно друга. При делении ядер у дрозофилы наблюдается соматический синапсис хромосом; этот синапсис обнаруживается в гигантских интерфазных ядрах слюнных желез и других клеток. Эти два факта указывают на то, что во время функционирования генов разные хромосомы и их части расположены так, что продукты действия генов могут образовываться или использоваться в определенной последовательности. У энотеры части хромосом в кольце из 14 хромосом, образующемся во время мейоза, располагаются очень упорядоченно из-за наличия гетерозиготных реципрокных транслокаций (глава 17). В этом случае также новое расположение участков хромосом может нарушить функциональные цепи и привести к эффектам положения. Действительно, известно, что у энотеры наблюдается эффект положения.

Нужно еще выяснить молекулярную основу эффектов положения у дрозофилы. Результаты, полученные при изучении систем контроля над действием генов у бактерий и у кукурузы, приводят нас к предположению, что эффекты положения у дрозофилы могут быть следствием влияния на образование или трансляцию информационной РНК данного цистрона изменения соседних с ним генов. Так как в ядре происходит синтез белка, то существует также возможность того, что эффекты положения могут быть результатом последовательных внутриядерных реакций, на которые влияет диффузия и, следовательно, концентрация белковых продуктов действия генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фенотипические изменения могут быть обусловлены различным расположением одного и того же генетического материала. Перемещение генов, дающее эффект положения, может быть вызвано структурными перестройками хромосом или перекрестом.

Линейные скопления генов со сходными эффектами возникли, возможно, в результате одной или нескольких дупликаций гена-родоначальника *in situ*, за которыми следовало мутирование, приведшее к различиям в их действии.

Эффект положения приписывается изменениям одного или нескольких из нижеперечисленных процессов:

- 1) образование данной информационной РНК;
- 2) трансляция этой информационной РНК;
- 3) взаимодействие между белками, получающимися при трансляции информационных РНК в ядре.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

38.1. Если одновременно с качественным или количественным изменением генетического материала появляется новый, ранее неизвестный фенотип, то можно ли определить, чем вызван этот эффект — мутацией или эффектом положения? Объясните.

38.2. Ожидаете ли Вы обнаружить эффекты положения у большинства размножающихся половым путем организмов? Почему?

38.3. Возможен ли неравный перекрест? Объясните.

38.4. Можно ли считать псевдоаллели скорее субгенами (частями одного гена), чем отдельными неаллельными генами? Объясните.

38.5. Необходим ли псевдоаллелизм, чтобы обнаружить эффект положения? Объясните. Справедливо ли обратное? Объясните.

38.6. Какие нужно провести скрещивания, чтобы проверить, не являются ли псевдоаллелями две рецессивных мутации у дрозофилы, которые, по-видимому, аллельны сцепленному с полом гену v^+ (нормальный аллель киноварного цвета глаз)?

38.7. Используя подходящие генетические маркеры, нарисуйте тетрадную конфигурацию, позволяющую идентифицировать нити, у которых произошел внутрихромосомный обмен в области Bar X-хромосомы *Drosophila melanogaster*.

38.8. Используя понятие оперона, объясните, как парацентрическая инверсия в X-хромосоме дрозофилы может привести к цвету глаз типа mottled.

38.9. Предложите молекулярное объяснение цис-транс-эффекта положения, обнаруженного для области white X-хромосомы дрозофилы.

38.10. Может ли эффект положения наблюдаться у гаплоидов? Почему?

ЛИТЕРАТУРА

- C. B. Bridges. The Bar Gene a Duplication.— Science, 1963, 83, 210. Reprinted in «Classic Papers in Genetics». J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, 1959, p. 163.
- A. Chovnick, A. Schalet, R. P. Kernaghan and M. Krauss. The Rosy Cistron in *Drosophila melanogaster*: Genetic Fine Structure Analysis Genetics, 1964, 50, 1245.
- E. B. Lewis. The Pseudoallelism of White and Apricot in *Drosophila melanogaster*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1952, 38, 953.
- E. B. Lewis. Genes and Developmental Pathways.— Amer. Zool., 1963, 3, 33.
- H. J. Muller, A. A. Prokofyeva-Belgovskaya and K. V. Kossikov. Unequal Crossingover in the Bar Mutant as a Result of Duplication of a Minute Chromosome Section, C. R. (Dokl.), Acad. Sci. U. S. S. R., N. S., 1936, 1 (10), 87. (Г. Меллер, А. Прокофьева-Бельговская, К. Косиков. Докл. АН СССР, нов. сер., 1936, 1(10), 87).
- H. M. Peterson and J. R. Laughnan. Intrachromosomal Exchange at the Bar Locus in *Drosophila*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 126.
- A. H. Sturtevant. The Effects of Unequal Crossingover at the Bar Locus in *Drosophila*.— Genetics, 1925, 10, 117. Reprinted in «Classic Papers in Genetics». J. A. Peters (Ed.). Englewood Cliffs, 1959, p. 124.
- W. J. Welshons and E. S. von Halle. Pseudoallelism at the Notch Locus in *Drosophila*.— Genetics, 1962, 47, 743.

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА —
ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ

МЛЕКОПИТАЮЩИЕ

Синтез ДНК в относительно деспирализованной хромосоме *E. coli* происходит почти непрерывно, поэтому можно предположить, что вообще синтез комплементарной ДНК и РНК может происходить в деспирализованных хромосомах. С другой стороны, синтез ДНК не происходит во время митоза или мейоза, когда хромосомы конденсированы. Следовательно, мы можем считать, что в спирализованном состоянии хромосома не может функционировать, синтезируя ДНК или РНК. Если эти посылки приемлемы, то можно думать, что наличие сильно окрашиваемого по Фельгену, собранного в комки хромосомного материала (хроматиновых глыбок, или *кариосом*) во время интерфазы указывает на спирализацию хромосомного материала и, следовательно, на полное отсутствие в таких телах генетической активности.

Тот факт, что одни хромосомы или участки хромосом собраны в плотные комки и спирализованы, тогда как другие — нет, коррелирует, по-видимому, с разным временем репликации в них ДНК. Хромосомы и участки хромосом, спирализованные и окрашивающиеся обычным образом (*эупикнотические*), более спирализованные и сильнее окрашивающиеся (*гиперпикнотические*) и те, которые относительно деспирализованы и окрашиваются слабее (*гипопикнотические*), различаются по времени, когда в них происходит синтез ДНК. Одним из признаков гетерохроматина является его непормальное окрашивание, *гиперпикноз* (стр. 168).

Вышеизложенная гипотеза об активности гена может быть проверена путем сравнения активности генов в интерфазе в случаях, когда данный участок хромосомы спирализован нормально и когда он спирализован сильнее обычного. Во многих диплоидных интерфазных ядрах у мужчин видна маленькая кариосома, связанная с ядерной мембраной. В таких же клетках у женщин видна такая же кариосома, но величина ее гораздо больше. Так как величина этой хроматиновой глыбки зависит от пола, то избыточный материал кариосомы у женщины был назван *половым хроматином* или *тельцем Барра* (который его открыл). Было исследовано наличие полового хроматина у людей, являющихся анэусомиками по половым хромосомам. Максимальное число обнаруженных отдельных телец Барра таково: у людей XY или XO их нет; одно тельце у XX, XXU и XXUU; два — у XXX и XXXU; три — у людей XXXX. Оказалось, что в тех клетках, где количество телец Барра меньше максимального, больше их величина. Поэтому можно сделать заключение, что максимальное число телец Барра на единицу меньше числа X-хромосом у диплоидного индивидуума. В тетраплоидных клетках мужчины правильных телец Барра, по-видимому, нет. Кариосомы большего размера, о которых шла речь, представляют собой соединение небольших кариосом двух X. Наличие двух телец Барра в тетраплоидных клетках женщины свидетельствует о том, что максимальное количество телец Барра определяется равновесием между числом X-хромосом и числом аутосомных наборов. Одна X-хромосома, уравновешенная двумя наборами аутосом, не вызывает появления тельца Барра. Однако каждая X-хромосома, которая имеется сверх этого равновесия, конденсируется и либо обнаруживается как тельце

це Барра, либо смешивается с другой избыточной X-хромосомой, образуя тельце большего размера. Следовательно, максимальное число телец Барра равно $x - (p/2)$, где x — число X-хромосом, а p — полиидность, или число наборов аутосом (D. Harnden). Отметим, что Y-хромосома не влияет на число телец Барра. Следовательно, гены, определяющие пол, в частности гены, расположенные в Y-хромосоме, не подавляют образования телец Барра у нормальных и необычных мужчин.

Согласно рассматриваемой гипотезе, каждая лишняя X-хромосома очевидно спирализована сильнее обычного и функционально неактивна. Однако она еще способна реплицироваться во время интерфазы, хотя ее репликация и задержана (M. Grumbach, A. Morishima and Y. Taylor, 1963). То обстоятельство, что у женщин нет нормальной ткани, в которой когда бы то ни было в 100% ядер были бы обнаружены тельца Барра, частично может объясняться ошибками в цитологическом исследовании. Может быть также, что в некоторых клетках, в которых тельца Барра не видны, в этот момент происходит репликация X-хромосомы. Очевидно, что как у мужчин, так и у женщин — как у нормальных, так и у необычных — в результате образования телец Барра оказывается одно и то же количество функционирующих генов X-хромосом на диплоидный набор аутосом (M. Lyon, 1962). Иными словами, мужчины и женщины могут по существу не очень сильно различаться, по крайней мере по количеству функционирующих X-хромосом.

В X-хромосоме человека (см. рис. 10—6) имеется ген, необходимый для образования фермента *глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* (Г-6-ФД). Одна из мутаций в X-хромосоме приводит к неспособности образовывать этот фермент. Поэтому мужчины с нормальной X-хромосомой могут образовывать этот фермент, а мужчины с мутантной X-хромосомой — не могут. Так как Y-хромосома не влияет на образование этого фермента, то, очевидно, в ней нет аллеля этого гена. При исследовании отдельных эритроцитов генетически нормальных мужчин и женщин активность Г-6-ФД в них оказывается одинаковой (E. Beutler, M. Yeh and V. Fairbanks, 1962; D. Davidson, H. Nitowsky and B. Childs, 1963). Естественно было ожидать, что если бы у женщины оба нормальных аллеля работали так же, как один из них работает у мужчины, то ее эритроциты продуцировали бы вдвое больше фермента, чем эритроциты нормального мужчины. Однако, когда были исследованы эритроциты женщин, гетерозиготных по мутации, сцепленной с X, то некоторые из клеток оказались нормальными, а некоторые дефектными по Г-6-ФД. Эритроцитов с промежуточной активностью обнаружено не было. Это показывает, что такие женщины являются функциональными мозаиками по данному локусу. Некоторые из их эритроцитов произошли от клеток, содержащих ядра, в которых не функционировал нормальный ген, а функционировал дефектный локус; другие — из клеток, где не работал мутантный ген, а нормальный локус работал. Уже упоминавшиеся результаты, полученные для нормальных женщин, подтверждают общий вывод, что у диплоидных женщин в любой клетке может проявляться лишь один аллель этого локуса. Иногда функционирует локус, полученный от отца, а иногда — полученный от матери. Это заключение подтверждается тем, что у женщин, не содержащих мутацию по Г-6-ФД, клетки XO, XX, XXXY или XXXX, которые в отношении остальных хромосом диплоидны, образуют одинаковое количество Г-6-ФД.

Заболевание *дистрофия мышц, сцепленная с полом*, обусловлено редкой мутацией в гене, находящемся в X-хромосоме, и поэтому обычно бывает лишь у мужчин. Дистрофия мышц тесно связана с определенными энзиматическими и гистологическими аномалиями. При исследовании женщин, гетерозиготных по этой мутации, у которых наблюдалась клиническая или субклиническая дистрофия мышц (C. Pearson, W. Fowler

а. S. Wright, 1963), были обнаружены мышечные волокна двух видов — нормальные и дистрофичные. Это прекрасно объясняется функциональной мозаичностью, так же как и для локуса Г-6-ФД. Такого типа результаты получены по крайней мере для пяти других генов, сцепленных с X-хромосомой. На основании этих генетических данных и цитологических исследований телец Барра мы можем сделать вывод, что обычно заметная часть одной из X-хромосом во многих диплоидных соматических клетках женщины инактивирована. Так как у нормального мужчины нет тельца Барра, то инактивированной является конденсированная X-хромосома. При оплодотворении у человека еще нет полового хроматина. Он впервые появляется примерно на 12-е сутки развития.

Исходя из цитологии телец Барра и инактивации примерно полудюжины разных локусов, нельзя еще определить, какая часть X-хромосомы у нормальной женщины инактивирована. Для этого нужно выявить дополнительно другие локусы X-хромосомы, активность генов в которых можно было бы изучать в отдельных клетках. Изучение гена, в результате действия которого появляется продукт, способный диффундировать между клетками, мало пригодно для определения размера инактивированного сегмента.

Половой хроматин встречается не только у человека, но и у многих других млекопитающих (M. Barr, 1959). У мышей нет полового хроматина, но одна из X-хромосом самки гиперпикнотична во время митоза. Был обнаружен один локус, который не проявляет ожидаемой инактивации (L. Russell, 1963). Это указывает на наличие в X-хромосоме такого участка, который у самки не оказывается гетеропикнотичным и поэтому не инактивируется. Так как у мыши встречаются реципрокные транслокации между X-хромосомой и аутосомами, то возникает вопрос, не влияют ли такие перестройки на функционирование перемещенных генов аутосом. Этот вопрос может быть исследован у самок, гетерозиготных по такой транслокации, когда нетранслоцированная гомологичная аутосома содержит подходящие рецессивные аллели генов, локусы которых охватывают значительную часть группы сцепления. В некоторых случаях получился фенотип, соответствующий нормально доминантному аллелю, находящемуся в структурно перестроенной аутосоме, в других — появились крапчатые, или мозаичные, фенотипы. Кроме того, согласно данным, полученным при исследовании различных перестроек между какой-нибудь определенной аутосомой и X-хромосомой, в случае мозаичного фенотипа доля тела, имеющая рецессивный фенотип, уменьшается по мере увеличения расстояния от аутосомного локуса до точки соединения фрагмента с X-хромосомой. Следовательно, аутосомные локусы могут инактивироваться при переносе их в X-хромосому, причем чем больше расстояние от локуса до точки разрыва, тем меньше инактивация. Так как разрыв аутосомы случается в разных местах, то было обнаружено, что уменьшение степени инактивации происходит в любом направлении по хромосоме. Таким образом, инактивация аутосомного локуса в перестройках между X и аутосомой может объяснить случаи *эффекта положения мозаичного типа (V-типа)*.

Было установлено, что в двух случаях точки разрыва аутосомы, приводящие к перестройке с X-хромосомой, расположены в несколько разных местах, хотя обе они близки к данному гену. В одном случае нормальный аутосомный аллель был инактивирован и привел к мозаичности. В другом же случае мозаичности не получилось. Результаты анализа последнего случая решительно подтвердили, что подавленный ген дикого типа находился в аутосомном фрагменте, соединившемся с неспособной вызывать инактивацию областью X-хромосомы.

Эти исследования показывают (так же как и уже упоминавшийся случай, по-видимому, несупрессируемого локуса X-хромосомы), что обычно

в сегменте, который замещается фрагментом аутосомы, некоторые гены X-хромосомы около точки разрыва всегда функционально активны. Следовательно, есть две возможные причины стабильности аутосомного гена, встроенного в X-хромосому: присоединение его к той части X-хромосомы, которая неспособна вызывать инактивацию, или значительное удаление его от части X-хромосомы, способной вызывать инактивацию.

В свете предыдущего обсуждения можно допустить, что один и тот же генетический материал может быть гетерохроматическим или эухроматическим, и что основным определяющим фактором является степень спирализации. Очень сильная спирализация хромосомы в интерфазе, очевидно, препятствует функционированию находящихся в ней генов. У млекопитающих эта система, по-видимому, уравнивает различие в дозе гена, существующее между самцами и самками. Иными словами, эта система обеспечивает *дозовую компенсацию* в отношении некоторых локусов, находящихся в X-хромосоме (M. Lyon, 1962).

Следует отметить, что у млекопитающих функционирование участков некоторых хромосом может становиться более или менее постоянно закрепленным (R. De Mars, 1963). Мозаичность у мышей, которую мы уже обсуждали, проявляется в участках ткани с разными фенотипами. Если в данной клетке какой-либо сегмент хромосомы функционально выключен (или включен), то и в клетках, происходящих из нее, соответствующие сегменты тоже выключены (или включены), несмотря на то, что между родоначальной и дочерними клетками лежит митоз. Поэтому в результате получается участок ткани с одним фенотипом. Такое выключение происходит у мыши и, как уже говорилось, у человека позднее, чем через неделю после оплодотворения. Кроме того, по крайней мере иногда, оно происходит и в поколении половых клеток. Так, несмотря на то, что в соматических тканях взрослой самки крысы одна из X-хромосом гиперпикнотична, бивалент XX в овоците *изопикнотичен*, т. е. обе его хромосомы окрашиваются одинаково (S. Ohno, W. Kaplan, R. Kinoshita, 1960). На основании этого М. Лайон и Д. Шварц высказали предположение, что ген может существовать в двух функциональных формах, активной и неактивной, и что одна форма сохраняется, несмотря на происходящие деления ядра, вплоть до специфического перехода в другую форму. Было обнаружено, что у кукурузы в зиготе некоторые гены продолжают оставаться в том же состоянии, что и во время гаметогенеза. Например, было показано, что в эндосперме продолжают работать гены, пришедшие от материнского растения, тогда как аллели, полученные от отца, неактивны.

ДРОЗОФИЛА

У дрозофилы, как и у человека, обычные самцы имеют одну X-хромосому, а обычные самки — две. Многие из локусов X-хромосомы обладают по существу одинаковым фенотипическим эффектом и у самцов и у самок, т. е. многие локусы проявляют дозовую компенсацию. Так, цвет глаз у самца *apr/Y* и у самки *apr/apr*, по существу, одинаков. Дозовая компенсация касается не только гипоморфных мутаций (стр. 209) вроде *argicott*, но и их аллелей дикого типа. Поэтому, например, и у самок, и у самцов дикого типа глаза имеют один и тот же красный цвет. Дозовую компенсацию обнаруживают и другие локусы X-хромосомы *D. melanogaster*: *u*; *ac*; *sc*; *sn*; *g*; *f* и *B*. Однако *fa* компенсируется лишь частично, так как у самок эффект оказывается несколько большим, чем у самцов. Нет дозовой компенсации у генов *Hw* (*hairy wing* — волосатые крылья), *w^e* (*eosin*), *wⁱ* (*ivory*) и ни у одного из аутосомных генов, а также у *bb*, чей локус имеется и в X- и в Y-хромосоме и поэтому обычно его два как у самцов, так и у самок.

Цитологические основы дозовой компенсации трудно исследовать в обычных соматических клетках дрозофилы из-за небольшого размера диплоидного ядра. Так как полинемные X-хромосомы, находящиеся в состоянии соматического спинакса в слюнных железах личинок самок, и хромосомы в других ядрах, по-видимому, одинаковы, то маловероятно, чтобы дозовая компенсация у дрозофилы основывалась на различиях в спирализованности гомологичных хромосом. Возможно, это означает, что аллели в обеих X-хромосомах самки функционируют одинаково и что у дрозофилы дозовая компенсация осуществляется с помощью механизма, отличного от механизма, имеющегося у млекопитающих. Хотя, как и следовало ожидать, содержание ДНК в отдельной X-хромосоме клетки слюнной железы самца вдвое меньше, чем в двух X-хромосомах соответствующей клетки самки, однако, по-видимому, отдельная X-хромосома содержит примерно столько же РНК и белка, как и пара X-хромосом. Поэтому дозовая компенсация включает «увеличение» активности гена отдельной X-хромосомы, или супрессию действия генов пары X-хромосом, или и то, и другое. На дозовую компенсацию у дрозофилы пролили свет многие генетические исследования, и их результаты можно описать на примере аллеля *apr*. У самок с тройной дозой *apr* (лишний локус *apr* находится не в X-хромосоме) глаза более темного абрикосового цвета, чем у самок *apr/apr*. Это показывает не только гипоморфную природу мутации, но также и направление дозовой компенсации — а именно, подавление образования глазного пигмента у самок *apr/apr* до уровня, который вызывает один локус *apr* в X-хромосоме самца. У самцов с лишним локусом *apr* цвет глаз еще более темный, чем у самок с тройной дозой *apr*.

Так как цвет глаз у самцов XO и XY и у самок XX, XXU и XXUU, чистых по *apr*, одинаков, то Y-хромосома не может быть ответственной за дозовую компенсацию. К тому же самцы, произошедшие от самок (X^{apr} X^{apr} , *tra tra*), как с Y-хромосомой, так и без нее, имеют глаза такого же цвета, что и самцы $X^{apr}Y$. Если бы «самцовость» как таковая препятствовала супрессии действия гена, приводя к дозовой компенсации, то у самцов с двойной дозой *apr*, трансформированных из самок, глаза были бы более темного абрикосового цвета, чем у самцов с единичной дозой *apr*. Следовательно, дозовая компенсация не зависит от мужского или женского фенотипа.

Какова генотипическая основа дозовой компенсации у дрозофилы? Самец с двумя целыми X-хромосомами (трансформированный из самки) обнаруживает дозовую компенсацию, тогда как самец с одной X^{apr} и другим геном *apr* — либо в X-хромосоме с очень большой нехваткой, либо в аутосоме — не показывает компенсации. Это говорит о том, что сама X-хромосома содержит гены — компенсаторы дозы и что у самцов имеется единичная, а у самок — двойная доза таких генов. По-видимому, целая X-хромосома содержит несколько компенсаторов дозы, подавляющих один ген *apr*. У обычного самца $X^{apr}Y$ эта супрессия допускает лишь абрикосовый цвет глаз. Заметим, что у самок, у которых в одной X-хромосоме имеется делеция области *apr*, а в другой хромосоме *apr* присутствует, глаза светло-абрикосового цвета.

Можно получить чистых по *apr* самцов или самок, гиперплоидных по различным коротким сегментам X-хромосомы и регистрировать их пол и цвет их глаз. Такие опыты показали, что:

1) разные сегменты X-хромосомы могут обладать или не обладать эффектом дозовой компенсации по цвету глаз, но дают общий эффект супрессии;

2) влияние этих сегментов на цвет глаз не коррелирует с их влиянием на половую дифференцировку.

Кроме того, когда изучались другие локусы, для которых наблюдается дозовая компенсация, то оказалось, что влияние отдельных сегментов на эффекты дозовой компенсации различно. Поэтому мы делаем вывод, что:

1) нет корреляции между набором генов-компенсаторов и их влиянием на половую дифференцировку;

2) разные гены, обнаруживающие дозовую компенсацию, подавляются либо разными группами генов-компенсаторов дозы, либо одной и той же группой генов-компенсаторов, действие которых меняется в зависимости от локуса, компенсация которого происходит.

Сцепленные с X-хромосомой гены и аллели, не показывающие дозовой компенсации, могут быть в эволюционном отношении настолько новыми, что могли еще не установиться гены-компенсаторы дозы. Эту точку зрения подтверждает тот факт, что *eosin* (w^o) и *ivory* (w'), для которых не наблюдается дозовой компенсации, неаллельны *apr* (M. Green, 1959), и, следовательно, могут быть мутациями локуса, появившегося сравнительно недавно. Свидетельствуют об этом также и данные, полученные при исследовании мутаций в X-хромосоме *D. pseudoobscura*, приводящих к появлению V-образной хромосомы, одно плечо которой гомологично X, а другое — левому плечу хромосомы III *D. melanogaster*. Если мы предположим, что большинство мутантов гипоморфны, то в плече, гомологичном X-хромосоме *melanogaster*, будет больше мутаций, дающих одну и ту же степень фенотипического эффекта и у самок и у самцов (показывая, возможно, дозовую компенсацию), чем их оказывается в плече, гомологичном левому плечу хромосомы III *melanogaster*¹.

В качестве рабочей гипотезы мы можем принять, что супрессия, приводящая к дозовой компенсации у дрозофилы, тесно связана с информационной РНК. Информационная РНК (и белковый продукт) генов-компенсаторов может либо взаимодействовать с информационной РНК тех генов, которые они компенсируют, и инактивировать их, или они могут действовать непосредственно на ген, который должен быть скомпенсирован, препятствуя образованию на нем информационной РНК. Эта супрессия может основываться на том, что информационные РНК всех компенсаторов дозы имеют некоторую общую нуклеотидную последовательность (стр. 474), комплементарную или эквивалентную последовательности ДНК в супрессируемом локусе. Возможно, гены-операторы компенсируемых локусов супрессируются генами-компенсаторами дозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дозовая компенсация для генов, сцепленных с X-хромосомой, достигается подавлением их функционирования.

У человека, мыши и, вероятно, всех имеющих половой хроматин млекопитающих это подавление связано с гетеропикнозом и, следовательно, со спирализацией хромосомы. Несмотря на то, что дифференциация хромосомы носит временный характер, дозовая компенсация и другие ядерные явления показывают, что хромосома может оказаться более или менее надолго определенным образом зафиксированной, что связано с ее функционированием.

У дрозофилы регуляция действия гена, приводящая к дозовой компенсации, осуществляется другим механизмом. Предполагается, что этот процесс затрагивает транскрипцию, трансляцию или белковый продукт информационной РНК. Возможно, гены-компенсаторы дозы являются генами-регуляторами, которые контролируют гены-операторы компенсируемых локусов.

¹ Предыдущее обсуждение дозовой компенсации у дрозофилы в значительной мере следует работе Г. Меллера (H. Muller, 1950).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

39.1. Если по существу целиком функционально выключена одна X-хромосома в соматической ткани женщин, то почему невыгодно иметь $\text{♀} = \text{XO}$ и $\text{♂} = \text{XY}$?

39.2. Почти все без исключения разношерстные или черепаховые кошки являются самками. Почему?

39.3. Какого типа аутосомные гены не пригодны для опытов с мышами, описанных на стр. 497?

39.4. Обсудите фенотипы, ожидаемые у женщин, гетерозиготных по мутации гемофилии, сцепленной с X.

39.5. Сравните механизмы дозовой компенсации у мыши и у дрозофилы.

39.6. Как можно проверить гипотезу о дозовой компенсации, исследуя близнецов?

39.7. Как Вы объясните появление женщин, гетерозиготных по сцепленной с X мутацией дальтонизма, но являющихся дальтовыми только по одному глазу или даже части глаза, а также женщин — идентичных близнецов, одна из которых дальтоник, а другая — нет?

39.8. Глазной альбинизм обусловлен мутацией, сцепленной с X, которая вызывает бесцветность сетчатки у мужчин. Какой фенотип ожидаете Вы встретить у гетерозиготных женщин, если мутация

а) полностью рецессивна?

б) полностью доминантна?

в) частично доминантна?

У таких женщин на самом деле есть участки как бесцветной, так и нормально окрашенной сетчатки. Какое значение имеют эти данные для ответов на поставленные выше вопросы а), б) и в)?

39.9. Сцепленная с X-хромосомой мутация у мужчины препятствует выделению пота в любой части тела. Что, по Вашему мнению, произойдет с человеком, гетерозиготным по этой мутации, если, предварительно осыпав тело сухой смесью крахмала и йода, он войдет в теплицу?

39.10. Как Вы объясните отсутствие фенотипической эквивалентности у женщин XO, XX и XXX (или у мужчин XY и XXY)? Справедлив ли Ваш ответ для самок мышей, у которых XO обычно плодовита?

39.11. Что Вы думаете о гипотезе, согласно которой дозовая компенсация у млекопитающих происходит вследствие того, что одна хромосома (или ее часть) преждевременно используется в качестве матрицы?

39.12. К какому выводу Вы придете, узнав, что у женщин, гетерозиготных по аномальной X-хромосоме (причем эта хромосома имеет форму или кольца, или палочки, которая короче или длиннее обычной X-хромосомы), последняя появляется в тельцах Барра чаще, чем ее нормальный гомолог?

39.13. Обсудите значимость работы с жабой *Xenopus* (рассмотренной на стр. 440) в связи с проблемой дозовой компенсации.

ЛИТЕРАТУРА

- M. L. Barr. Sex Chromatin and Phenotype in Man.—Science, 1959, 130, 679.
E. Beutler, M. Yeh and V. F. Fairbanks. The Normal Human Female as a Mosaic of X-Chromosome Activity; Studies Using the Gene for G-6-PD-Deficiency as a Marker.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 9.
A. G. Cock. Dosage Compensation and Sex-Chromatin in Non-Mammals.—Genet. Res. 1964, 5, 354.
R. G. Davidson, H. M. Witowsky and B. Childs. Demonstration of Two Populations of Cells in the Human Female Heterozygous for Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 481.
R. DeMars. Sex Chromatin Patterns and the Lyon Hypothesis.—Science, 1963, 141, 649.

- M. M. Grumbach, A. Morishima and J. H. Taylor. Human Sex Chromosome Abnormalities in Relation to DNA Replication and Heterochromatinization.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 581.
- Human Genetics.—Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1965, v. 29.
- M. F. Lyon. Sex Chromatin and Gene Action in the Mammalian X-Chromosome.—Amer. J. Hum. Genet., 1962, 14, 135.
- V. A. McKusick. On the X-Chromosome of Man. Washington, 1964.
- H. J. Muller. Evidence of the Precision of Genetic Adaptation. The Harvey Lectures (1947—1948). Ser. 43, p. 165, 1950. Отрывки помещены в кн.: H. J. Miller. Studies in Genetics, 1962, p. 152.
- S. Ohno, W. D. Kaplan and R. Kinosita. On Isopycnotic Behavior of the XX-Bivalent in Oocyte of *Rattus norvegicus*.—Exp. Cell. Res., 1960, 19, 637.
- C. M. Pearson, W. M. Fowler and S. W. Wright. X-Chromosome Mosaicism in Females with Muscular Dystrophy.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 50, 24.
- L. B. Russell. Mammalian X-Chromosome Action: Inactivation Limited in Spread and in Region of Origin.—Science, 1963, 140, 976.
- L. B. Russell. Another Look at the Single-Active-X Hypothesis.—Trans. N. Y. Acad. Sci., Ser. II, 1964, 26, 726.
- L. B. Russell. Genetic and Functional Mosaicism in the Mouse.—Sympos. Soc. Study Devel. and Growth, 1964.
- C. Stern. Dosage Compensation — Development of a Concept and New Facts.—Canad. J. Genet. Cytol., 1960, 2, 105.
- W. J. Welshons. Cytological Contributions to Mammalian Genetics.—Amer. Zool., 1963, 3, 15.

Анализ
степени,
лирующ
В этой
ляции д
регуляц

ПОЛИНЕ

Данные,
вают, что
или пол
Н. Векс
спирали
интерфа
как кра

В ра
клеток д
образую
последов
тканей,
можно и
У дрозо
РНК, че
клеток д
больше

У не
слюнной
ние кот
хромосо
гранулы
ствует в
железы.

ния особ
и являю
гомолога

Инъе
зование
показано
но коли
цитозина
мы мож
непосред
двукрыл
пуфы, ч
не все г

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ У ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ

Анализ явлений, обсуждаемых в главах 37—39, не был доведен до такой степени, чтобы можно было говорить о биохимической природе контролирующих механизмов, участвующих в регуляции активности гена. В этой главе делается попытка проникнуть в молекулярные основы регуляции действия гена и поэтому приводятся дополнительные примеры регуляции действия гена у высших организмов.

ПОЛИНЕМНЫЕ ХРОМОСОМЫ ДВУКРЫЛЫХ

Данные, полученные с помощью радиоавтографии, убедительно показывают, что обычная хромосома высших организмов является полинемной, или политемной (W. Beermann, 1962; W. Beermann and U. Clever, 1964; H. Becker, 1964), т. е. в хроматиде содержится более одной двойной спирали ДНК (W. Peacock, 1963). Чрезвычайно высокую полинемность интерфазных хромосом личинок *Diptera* можно рассматривать просто как крайний вариант нормальной тенденции к полинемности.

В разные промежутки времени в процессе роста и дифференцировки клеток двукрылых различные диски полинемных хромосом этих клеток образуют «пуфы» (рис. 40—1), которые затем исчезают в определенной последовательности. Хотя эта последовательность варьирует для разных тканей, она характерна для каждой ткани личинки. Образование пуфов можно интерпретировать как локальное раскручивание хромосомы и ДНК. У дрозофилы и у комара *Chironomus* область пуфа синтезирует больше РНК, чем такая же область, не содержащая пуфа; в слюнных железах клеток личинок *Rhyncosciara* и *Glyptotendipes* область пуфа синтезирует больше ДНК, чем эквивалентный участок без пуфа.

У некоторых видов *Chironomus* в цитоплазме клеток одной из долей слюнной железы личинки находятся гранулы (белковый секрет?), появление которых обусловлено геном, локализованным у одного из концов хромосомы IV. У других видов таких гранул нет. В клетках, образующих гранулы, пуф находится также у кончика хромосомы IV, причем он отсутствует в клетках, не содержащих гранул, даже если это клетки той же железы. Более того, личинки, полученные путем межвидового скрещивания особей, образующих и не образующих гранулы, обладают гранулами и являются цитогенетически гибридными, другими словами, у одного гомолога пуф есть, а у другого он отсутствует.

Инъекция личинкам гормона окукливания — экдизона вызывает образование пуфов в одних дисках и их исчезновение в других. Было также показано, что в РНК, синтезированной пуфом, количество аденина не равно количеству урацила, а количество гуанина не равно количеству цитозина, и, по-видимому, эта РНК является информационной. Поэтому мы можем заключить, что образование пуфов (деспирализация ДНК) непосредственно связано с активностью гена. В клетке слюнной железы двукрылых, по-видимому, вообще только около 20% дисков образуют пуфы, что свидетельствует о том, что в каждом ядре функционируют не все гены.

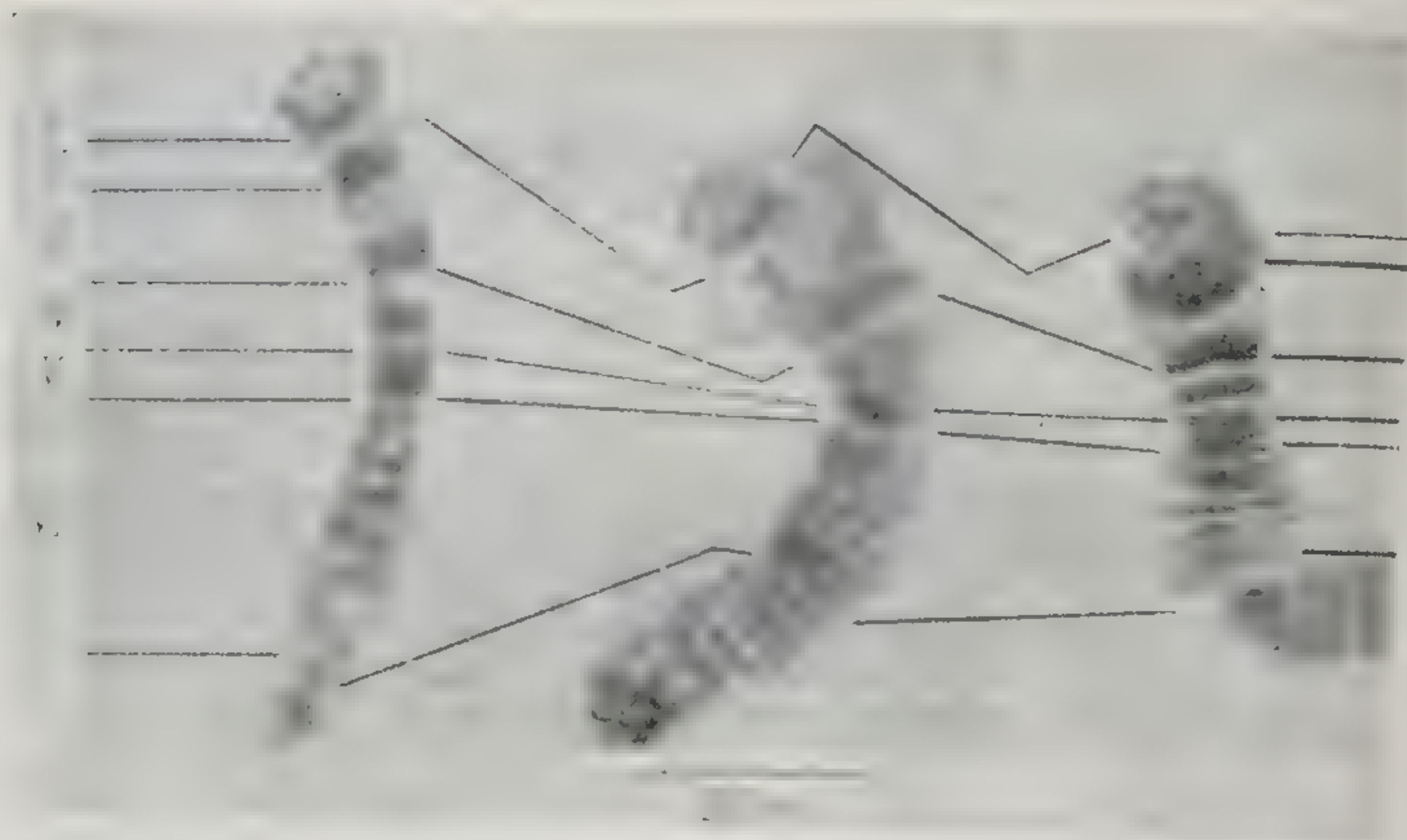


РИС. 40-1.

Образование и исчезновение пufов на участке хромосомы в слюнной железе *Rhyncosciara*.

Римские цифры — различные сегменты, слева — пре-пuff, в центре — пuff, справа — пост-пuff

«СОХРАНЯЮЩАЯСЯ» (CONSERVED) И «НЕСОХРАНЯЮЩАЯСЯ» (NONCONSERVED) ДНК

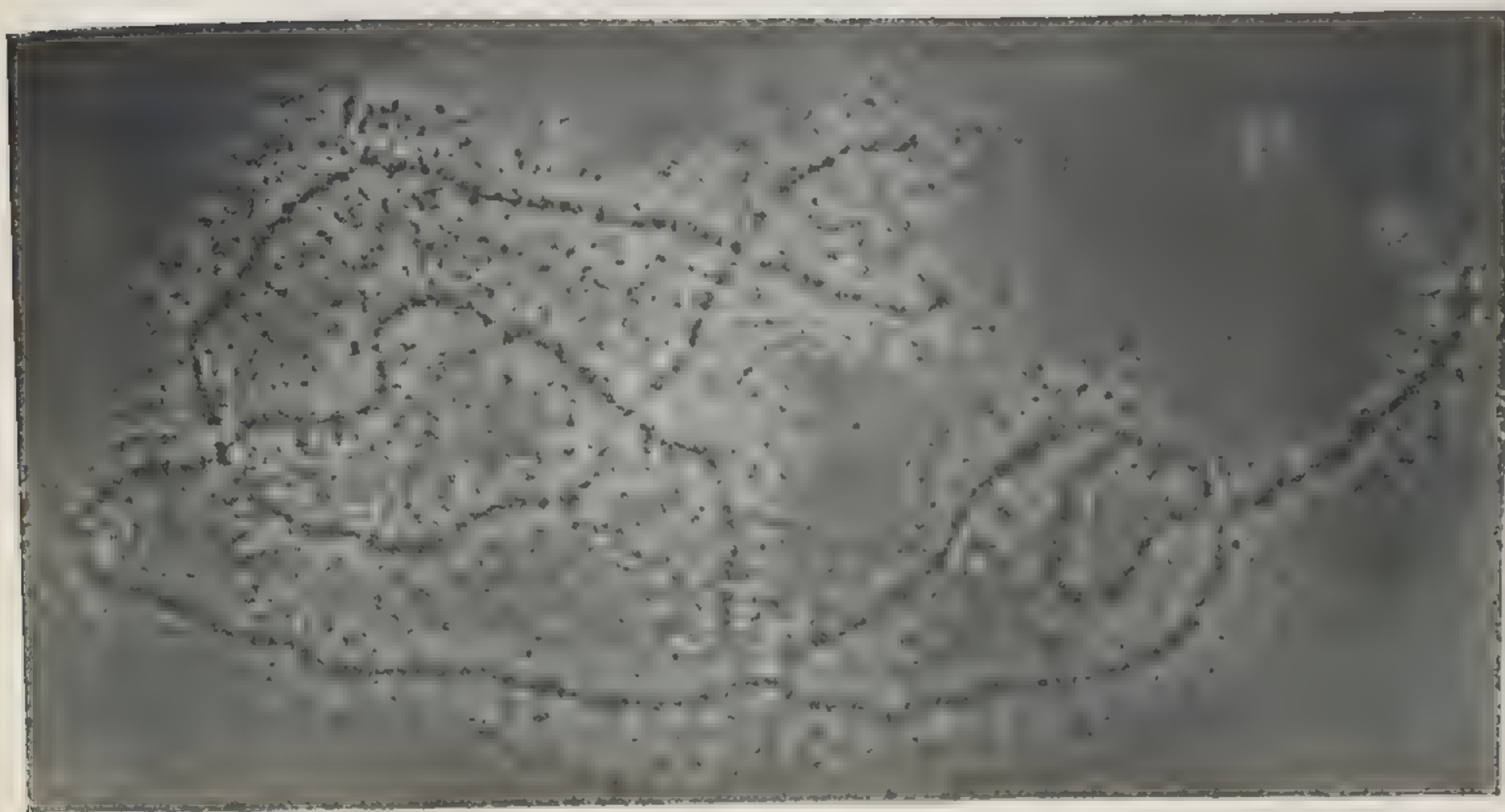
Какова природа и судьба синтезирующейся в «избытке» ДНК? Следующие данные показывают, что ДНК может покидать ядра, когда она находится в избытке, а также и вследствие других причин:

- 1) у некоторых организмов (например, у комара *Sciara*) часть хромосом, как правило, элиминируется из ядер некоторых клеток;
- 2) у дрозофилы ДНК выходит из ядер питающих клеток яичника;
- 3) в норме в части канальцев семенника кузнечика *Melanoplus differentialis* все клетки распадаются и освобождают большие количества ДНК (A. Lima de Faria a. T. Nordqvist, 1962);
- 4) овоцит тритона, по-видимому, содержит ДНК в нуклеоплазме и ядрышке (не связанную с организатором ядрышка), которая, вероятно, не остается в ядре (M. Izawa, V. Allfrey a. A. Mirsky, 1963);
- 5) сходные данные известны и в отношении овоцита двукрылых *Tipula* (A. Lima de Faria, 1962): внутри ядра этих клеток есть тельце, содержащее около 50% всей ядерной ДНК; хотя эта ДНК синтезируется в разное время на ДНК хромосом, тельце и содержащаяся в нем ДНК исчезают на стадии диплономы;
- 6) прорастающие семена пшеницы и растущие корни пшеницы и кукурузы содержат двунитчатую ДНК низкого молекулярного веса (10^5), которая обменивается, т. е. является метаболически лабильной (M. Sampson, A. Kato, Y. Hotta a. H. Stern, 1963); такая ДНК отличается от стабильной, высокомолекулярной ДНК тем, что содержит больший процент Г + Ц.

Хотя можно сделать вывод, что иногда ДНК выходит в цитоплазму, данные упомянутых исследований не позволяют считать, что эта ДНК обладает какими-либо известными или предполагаемыми свойствами генетического материала (репликация, мутация, рекомбинация) после того

РИС.
Гига
вые
А —
turus
раств
Б —
центр
ными

И. Герп

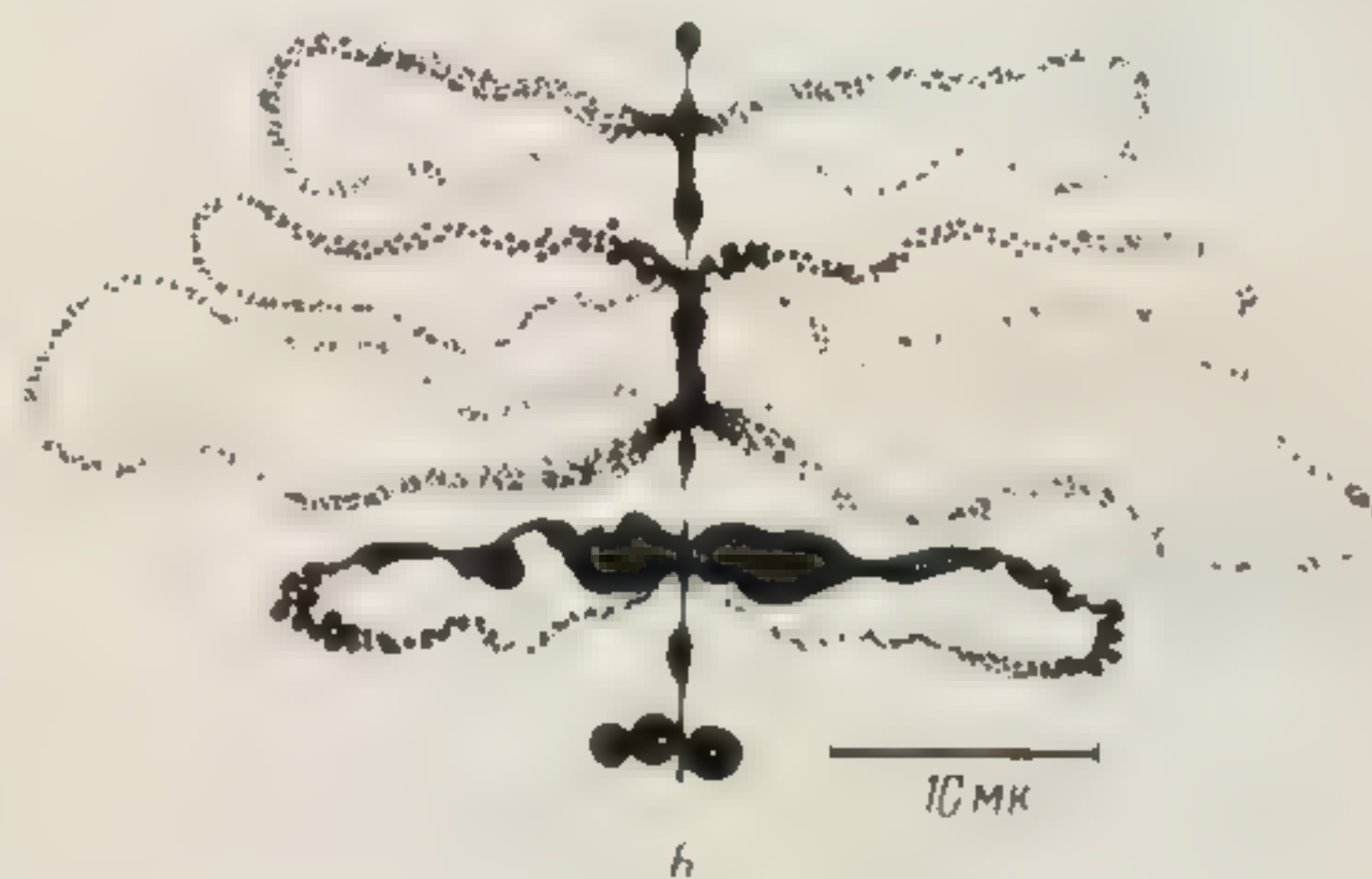


A

РИС. 40-2.

Гигантские хромосомы — «ламповые щетки» в ооците амфибий

A — нефиксированные хромосомы *Triturus viridescens* в физиологическом растворе (фазовый контраст, $\times 540$);
Б — полусхематическое изображение центральной хромомерной оси с парными боковыми петлями



И. Гершкович

как она покидает хромосому. Поэтому вопрос о том, является ли эта ДНК генетическим материалом, остается открытым.

Можно предположить, что ДНК, покидающая ядро, вне ядра будет обладать совсем другой функцией, отличающейся от той, которую несет ДНК внутри ядра. Например, ДНК ядерного происхождения, но локализованная в цитоплазме, могла бы служить строительным материалом для синтеза ядерной ДНК. Такая судьба может быть у ДНК спермиев, не участвующих в оплодотворении и распадающихся в цитоплазме яйцеклетки. Например, для некоторых насекомых характерна полиспермия (в яйцеклетку проникает несколько спермиев, но только один оплодотворяет ее). В пиявице ДНК, способная переходить в цитоплазму овоцита и, по-видимому, служить сырьем для будущего синтеза ДНК. По-видимому, то же самое происходит и с ДНК, фагоцитированной фибробластами и белыми кровяными клетками *in vivo*, так как при фагоцитозе ДНК клетками млекопитающих *in vitro* фагоцитированная ДНК появляется в ядре. Ряд фактов указывает на то, что потеря ДНК может быть связана с дифференцировкой: потеря части хромосомного материала в процессе диминуции хромосом у *Ascaris*; различия при элиминировании хромосом у разных полов *Sciara*; падение содержания ДНК в клетках слюнной железы улитки *Helix* по мере образования продукта секреции. Высказывалось также мнение, что цитоплазматическая ДНК может действовать как информационная (Р. Gahan, 1962; I. Holland и В. Mc Carthy, 1964).

На основании приведенных данных становится ясным, что не всегда вся ДНК остается в ядре, чтобы осуществлять там обычные функции ядерного генетического материала. Следовательно, в этом смысле существуют два типа ДНК: один, сохраняющийся как часть хромосомы (который служит генетическим материалом), и другой, не сохраняющийся в хромосоме (который может и не быть генетическим материалом). Выше уже указывалось, что у бактерий отсутствует консервация неинтегрированной в хромосому ДНК, участвующей в трансформации, конъюгации или трансдукции.

ХРОМОСОМЫ — «ЛАМПОВЫЕ ЩЕТКИ»¹

В овоцитах амфибий находятся гигантские хромосомы — «ламповые щетки» (рис. 40—2). Характерный внешний вид их определяется боковыми выступами многочисленных парных петель, отходящих от главной оси хромосомы.

Каждая петля асимметрична — один конец ее толще, чем другой. Кроме обычных пар петель, можно обнаружить гигантские петли, имеющие зернистое строение, тонкая осевая нить которых составляет единое целое с главной хромосомной осью и содержит плотный искривленный участок у более тонкого конца петли; более толстый конец этих петель состоит из грубого зернистого матрикса.

Если овоциты тритона с хромосомами — «ламповые щетки» проинкубировать с H^3 -уридином, то на радиоавтографах видно, что включение трития в пару гигантских зернистых петель происходит в определенной последовательности; оно начинается с тонкого конца петли и продвигается вдоль петли примерно в течение 10 дней.¹ Эти результаты показывают, что происходит последовательный синтез РНК разными участками петли. Другие данные свидетельствуют о том, что:

- 1) петли содержат ДНК;
- 2) наблюдающийся синтез РНК зависит от ДНК;

¹ Изложенные в этом разделе материалы основаны на работах В. Дюрье, И. Галла и Х. Каллана (1962), М. Ицава, В. Олфги и А. Мирского (1963).

3) агенты, подавляющие синтез ядерной РНК (такие, как актиномицин Д), вызывают исчезновение петель (и тормозят образование пuffed в полиемных хромосомах насекомых).

Все сказанное дает основание считать, что петля (как и пuffed) представляет собой временно деспирализованный участок хромосомной нити. Так как на толстом участке хромосомной петли синтетическая активность прекращается, то, по-видимому, здесь снова происходит спирализация и восстанавливается часть главной, неспособной к синтезу хромосомной оси. В то же самое время другие участки осевой нити деспирализуются, образуя тонкий конец петли, который продолжает синтезировать РНК. В любом случае ясно, что морфология каждого участка хромосомы тесно связана с его способностью синтезировать РНК.

Наличие большого числа петель в хромосомах — «ламповых щетках» показывает, что многие их участки синтезируют РНК. Почти все гранулы (хромомеры), расположенные вдоль главной оси хромосом — «ламповых щеток», имеют петли; однако в гигантских полиемных хромосомах, которые можно сравнить с хромомерами, в каждый данный момент только около 2% дисков образуют пuffed. Сравнение содержания белка, ДНК и РНК в хромосомах печени, слюнных желез двукрылых и хромосомах — «ламповых щетках» также позволяет предполагать, что в хромосоме овоцита синтетической активностью обладают многие локусы. Заслуживает внимания тот факт, что в хромосоме — «ламповой щетке» у тритона содержится примерно в 4 раза больше ДНК, чем в обычной хромосоме из диплоидной клетки тритона, а нуклеоплазма и ядрышки овоцитов содержат несохраняющуюся ДНК в количестве, равном количеству ДНК в хромосомах. Большая часть РНК, присутствующей в зрелом овоците амфибий, синтезируется на стадии «ламповых щеток», причем более чем на 90% это рибосомная РНК. Хромосомы типа «ламповых щеток» были обнаружены в растущих овоцитах различных организмов (моллюсков, птиц, млекопитающих), в том числе и в клетках лука (B. Nebel a. E. Coulon, 1962). Такое же строение имеет Y-хромосома в сперматоцитах дрозофилы (W. Veermann, O. Hess a. G. Meyer, 1963). Вполне возможно, что эта структура хромосом встречается гораздо чаще, чем это предполагалось раньше.

ГИСТОНЫ

Представленные данные убедительно показывают, что у самых разных организмов деспирализация хромосомы, сопровождающаяся демаскированием ДНК, необходима для того, чтобы ДНК могла использоваться в качестве матрицы. В головке зрелого Т-фага ДНК сильно спирализована. После прикрепления Т-фага ДНК деспирализуется и входит в клетку хозяина, где она сразу используется как матрица. Таким образом, функционирующая фаговая ДНК, по-видимому, деспирализована и не связана с белком. Так же, вероятно, обстоит дело при функционировании ДНК хромосомы *E. coli*. В противоположность ДНК бактерий и фагов, ДНК в хромосомах большинства клеток обычно связывается с основными белками (такими, как гистон или протамин), образуя дезоксирибонуклеопротеиды (стр. 238). Согласно уже приведенным соображениям, соединение ДНК с гистоном, вероятно, вызывает спирализацию, которая, в свою очередь, приводит к инактивации гена. Влияние гистонов на активность гена будет изложена ниже, после того, как мы рассмотрим некоторые их свойства.

После удаления ДНК из нуклеогистона гистон можно разделить электрофорезом, ультрацентрифугированием и хроматографией на много субфракций. Следовательно, данный тип клетки, по-видимому, содержит гетерогенную систему гистонов, состоящую из сотен видов разных молекул.

Эти молекулы сравнительно невелики — их молекулярный вес варьирует от 3500 до 74 000 — и различаются по аминокислотному составу. Один класс молекул сравнительно богат лизином (и пролином) и беден аргинином; в другом содержится много аргинина и мало лизина. При соединении ДНК с этими фракциями гистонов снова образуется нуклеогистон, в котором, как и в нативном нуклеогистоне, по-видимому, вся ДНК находится в комплексе с гистонами.

Дезоксирибонуклеогистон, реконструированный из чистой ДНК и очищенных хромосомных гистонов, имеет в диаметре примерно 35 Å. Вероятно, в таком нуклеогистоне белок равномерно покрывает ДНК; он может располагаться спирально вокруг ДНК и занимать один или оба желобка двойной спирали ДНК. Однако возможны и другие способы его расположения.

Интерфазный хроматин соматических клеток, по-видимому, содержит однородные структурные единицы. Эта единица в электронном микроскопе выглядит как палочка, диаметром приблизительно 160 Å, которая состоит из двух двойных спиралей ДНК (каждая имеет диаметр 20 Å). Обе двойные спирали закручены одна вокруг другой паранемически (стр. 232), а гистон, вероятно, занимает пространство между ними и вокруг них (V. Luzzati a. A. Nicolaieff, 1963; Y. Bonner a. P. T'so, 1964). Возможно, что гистоны синтезируются в ядрышке, которое, как сообщалось, содержит рибосомы.

Когда ДНК образует комплексы с гистонами, ее температура плавления (денатурации) повышается. Следовательно, в этом смысле гистоны стабилизируют ДНК (S. Felsenfeld, G. Sandeen a. P. von Hippel, 1963). Гистоны, богатые лизином, увеличивают температуру, требуемую для плавления половины ДНК гороха, от 70 до 81° С; половина ДНК нуклеогистона, содержащего богатый аргинином гистон, плавится при температуре 71°. Существует приблизительно линейная зависимость между содержанием в гистоне лизина и температурой плавления ДНК нуклеогистона. ДНК, находящаяся целиком в комплексе с протамином (сальмином или клупеином), плавится при той же температуре, что и чистая нативная ДНК.

Значительная часть хромосомной ДНК должна нести информацию для синтеза негистоновых белков; поэтому каждый участок этой ДНК не может быть связан со специфическим гистонами. Следовательно, данный тип гистона должен обладать способностью связываться с несколькими разными последовательностями ДНК.

ДНК эритроцитов уток, по-видимому, целиком находится в комплексе с гистонами, однако это имеет место не в каждой клетке. У гороха в развивающейся семядоли 5% ДНК не связано с гистонами; количество не связанной с гистонами ДНК в зародыше составляет 20%, а в растущих верхушечных почках — 30%. Эти данные заставляют предполагать, что по сравнению с дифференцированными клетками в активно растущих и синтезирующих белок клетках вне комплекса с гистонами содержится больше ДНК. Стабилизирующее влияние гистонов на ДНК может приводить к снижению матричной функции ДНК, вероятно за счет подавления расхождения ее нитей.

Изолированные ядра могут синтезировать комплементарную РНК, используя в качестве матрицы ДНК; большая часть этой образующейся РНК является информационной; часть составляет транспортная РНК. Добавление в инкубационную среду к изолированным ядрам тимуса теленка богатых аргинином гистонов не только приводит к снижению включения тимидина в ДНК, но и сильно подавляет синтез РНК (V. Allfrey, V. Littau a. A. Mirsky, 1963); гистоны, богатые лизином, в этом отношении значительно менее эффективны. Избирательное удаление гистонов из изолированных ядер приводит к увеличению синтеза РНК в 2—4 раза; возможно, что новообразованная в этом случае РНК является информа-

ционной, хотя состав ее оснований отличается от состава информационной РНК, образующейся в норме. Эти данные убедительно показывают, что использование ДНК как матрицы для синтеза ДНК и РНК подавляется гистонами, а отделение ДНК от гистонов может привести к образованию информационной РНК, синтез которой был бы до тех пор подавлен.

Некоторые данные (из работы Дж. Боннера и соавторов, 1963) свидетельствуют о том, что контроль генетической активности, осуществляемый гистонами *in vivo*, сохраняется не только в изолированных ядрах, но и в изолированном хроматине. В хроматине, выделенном из зародышей гороха, в котором 20% ДНК не связано с гистонами, при участии РНК-полимеразы и четырех обычных рибонуклеозидтрифосфатов может идти зависимый от ДНК синтез РНК; удаление гистона усиливает синтез РНК в 5 раз. ДНК, целиком находящаяся в комплексе в реконструированном нуклеогистоне, либо совсем неспособна к синтезу РНК, либо обеспечивает очень слабый синтез. В заключение следует отметить, что ДНК полностью сохраняет способность к синтезу РНК, если она вся находится в комплексе с богатым аргинином протамином.

Семядоли гороха синтезируют специфический *запасной глобулин семян*, который не образуется в других тканях гороха — таких, как почки или корни. Хроматин, выделенный из семядолей гороха, образует *in vitro* информационную РНК, которая используется рибосомами для образования этого глобулина. С другой стороны, хроматин, выделенный из почек гороха, не приводит к образованию этого белка; однако удаление гистона из хроматина почки гороха дает ДНК, которая обеспечивает синтез глобулина. Таким образом, мы видим, что в почке ген для синтеза глобулина в норме репрессирован гистонами (J. Bonner, R. Huang and R. Gilden, 1963).

В регуляции действия генов с помощью гистонов могут участвовать и другие механизмы (V. Allfrey, R. Faulkner and A. Mirsky, 1964). Ацетилирование концов уже образовавшихся гистонов приводит к синтезу комплементарной РНК *in vitro*, в то время как неацетилированные гистоны супрессируют синтез РНК. *Ацетилирование гистонов* может служить механизмом, контролирующим действие гена *in vivo*; это подтверждается данными о том, что конденсированный (нефункциональный) хроматин содержит меньший процент ацетилированного гистона, чем диспергированный (функциональный) хроматин (V. Littaw, V. Allfrey, J. Frenster and A. Mirsky, 1964).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пуфы в полинемах хромосомах двукрылых и петли в хромосомах — «ламповых щетках» овоцитов амфибий представляют собой деспирализованные генетически активные участки этих хромосом.

Существуют два типа ДНК, свойства которых различаются. Один тип — это сохраняющаяся (*conserved*) ДНК, которая находится в хромосомах и является генетическим материалом; другой тип — несохраняющаяся (*nonconserved*) ДНК, которая, хотя и происходит из ядра, может находиться и в цитоплазме. Нет четких свидетельств в пользу того, что несохраняющаяся ДНК обладает генетическими свойствами.

Основные белки образуют комплексы с ДНК. Эти комплексы являются дезоксирибонуклеогистонами или дезоксирибонуклеопротаминами. Нуклеопротамины и ДНК, не находящаяся в комплексе, могут участвовать в синтезе РНК, зависящем от ДНК. С другой стороны, различные гистоны обладают неодинаковой способностью подавлять синтез ДНК и зависящий от нее синтез РНК, если они комплексируются с ДНК, образуя нуклеогистоны. Нефункциональный хроматин содержит в процентном отношении меньше ацетилированного гистона, чем функциональный.

Подавление действия гена гистонами может осуществляться за счет увеличения температуры денатурации ДНК благодаря спирализации хромосомы или с помощью других, сейчас еще неизвестных способов. Во всяком случае, очень вероятно, что у высших организмов использование ДНК как матрицы регулируется в значительной степени гистонами.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

40.1. В чем состоит функция ядра (например, в эритроците утки), в котором, по-видимому, почти вся ДНК находится в комплексе с гистонами?

40.2. Обсудите наличие корреляции между температурами плавления ДНК, находящейся в комплексе с щелочными белками, и подавлением активности гена.

40.3. Как Вы можете интерпретировать наблюдение Г. Буша, обнаружившего, что во многих опухолях богатые лизином гистоны синтезируются с большой скоростью?

40.4. Как Вы можете объяснить наблюдение П. Р. Гросса, показавшего, что актиномицин D (в тех концентрациях, которые полностью подавляют образование информационной РНК) снижает, но не полностью подавляет синтез белка в неоплодотворенных яйцеклетках морского ежа?

40.5. Рассмотрите генетические факторы и факторы среды, влияющие на характер образования пуфов в полиемерных хромосомах личинок двукрылых.

40.6. Обсудите значение механизма обратной связи, рассматривая способы контроля генетической активности на молекулярном уровне.

40.7. Что Вы можете сказать о действии гена на основании следующего наблюдения: гистоны, связанные с конденсированным хроматином, ацетилированы (в расчете на единицу веса) в меньшей степени, чем гистоны, выделенные из диффузного хроматина.

40.8. Можете ли Вы объяснить, почему специфическая ДНК-аза переваривает конденсированный, но не диффузный хроматин?

40.9. Как Вы можете объяснить инертность хромосом спермиев животных, несмотря на то, что они содержат дезоксирибонуклеопротамины, а не дезоксирибонуклеогистоны?

40.10. Чэнгу, Голдхаберу и Дуннебахеру («Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 1964, v. 52, 709—715) удалось поддерживать (по крайней мере два года) культуры как нативных, так и инфицированных липовирусом клеток печени человека. Они установили, что инфицированные клетки содержали не более 10% ДНК незараженных родительских клеток. Можно ли в связи с этими результатами ответить на следующие вопросы: 1) какая часть генома необходима для поддержания целостности клеток и их репликации? 2) какова степень полиемерности хромосом?

40.11. При каких условиях могут клетки использовать однонитчатую ДНК в качестве матрицы для синтеза белка?

ЛИТЕРАТУРА

- V. G. Allfrey, R. Faulkner and A. E. Mirsky. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 786.
- V. G. Allfrey, V. C. Littau and A. E. Mirsky. On the Role of Histones in Regulating Ribonucleic Acid Synthesis in the Cell Nucleus. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 414.
- V. G. Allfrey and A. E. Mirsky. Evidence for the Complete DNA-Dependence of RNA Synthesis in Isolated Thymus Nuclei. — Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1590.
- H. J. Becker. Die genetischen Grundlagen der Zelldifferenzierung. — Naturwissenschaften, 1964, 51, 205, 230.

- W. Beermann. Riesenchromosomen.— *Protoplasma*, 1962, 6, 1.
- W. Beermann and U. Clever. Chromosome Puffs.— *Scient. Amer.*, 1964, N 210, 50.
(В Беерманн и У. Клевер. Хромосомные вздутия.— Сб. «Молекулы и клетки», М., изд-во «Мир», 1966).
- W. Beermann, O. Hess and G. F. Meyer. Structure and Function of the Y Heterochromatin in *Drosophila*.— *Proc. XVI Internat. Congr. Zool.*, 1963, 4, p. 283.
- D. P. Bloch. On the Derivation of Histone Specificity.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, 324.
- J. Bonner, R. C. C. Huang and R. V. Gilden. Chromosomally Directed Protein Synthesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 893.
- J. Bonner and P. O. P. Ts'o (Eds). Nucleo-Histones. First World Conference, 1964.
- E. H. Davidson, V. G. Allfrey, A. E. Mirsky. Gene Expression in Differentiated Cells.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 49, 53.
- E. H. Davidson, V. G. Allfrey and A. E. Mirsky. On the RNA Synthesized during the Lampbrush Phase of Amphibian Oögenesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 501.
- G. Felsenfeld, G. Sandeen and P. H. von Hippel. The Destabilizing Effect of Ribonuclease on the Helical DNA Structure.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 644.
- J. H. Frenster, V. G. Allfrey and A. E. Mirsky. Repressed and Active Chromatin Isolated from Interphase Lymphocytes.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 1026.
- P. B. Gahan. The Possible Genetic Significance of Cytoplasmic Deoxyribonucleic Acid. (Abstr.).— *Heredity*, 1962, 17, 603.
- J. G. Gall and H. G. Callan. H^3 -Uridine Incorporation in Lampbrush Chromosomes.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, 562.
- J. J. Holland and B. H. McCarthy. Stimulation of Protein Synthesis in vitro by Denatured DNA.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1964, 52, 1554.
- E. C. Horn. Extranuclear Histone in the Amphibian Oocyte.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, 257.
- R. C. C. Huang and J. Bonner. Histone, A, Suppressor of Chromosomal RNA Synthesis.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, 48, 1216.
- M. Izawa, V. G. Allfrey and A. E. Mirsky. The Relationship between RNA Synthesis and Loop Structure in Lampbrush Chromosomes.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 49, 544.
- M. Izawa, V. G. Allfrey and A. E. Mirsky. Composition of the Nucleus and Chromosomes in the Lampbrush Stage of the New Oocyte.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 59, 811.
- A. Lima de Faria. Metabolic DNA in *Tipula oleracea*.— *Chromosoma*, 1962, 13, 47.
- A. Lima de Faria and T. Nordqvist. Disintegration of H^3 -Labelled Spermatocytes in *Melanoplus differentialis*.— *Chromosoma*, 1962, 13, 60.
- V. Lizzati and A. Nicolaieff. The Structure of Nucleohistones and Nucleoprotamines.— *J. Mol. Biol.*, 1963, 7, 142.
- B. R. Nebel and E. M. Coulon. The Fine Structure of Chromosomes in Pigeon Spermatocytes.— *Chromosoma*, 1962, 13, 272.
- W. J. Peacock. Chromosome Duplication and Structure as Determined by Autoradiography.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 49, 793.
- M. Sampson, A. Katoh, Y. Hotta and H. Stern. Metabolically Labile Deoxyribonucleic Acid.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 459.
- Symposium on Macromolecular Aspects of the Cell Cycle.— *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1963, 62 (Suppl. 1).

РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — РОСТ,
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И РАЗВИТИЕ

В шести предыдущих главах рассматривались вопросы регуляции синтеза гена и его действия. Цель настоящей главы — показать, как те генетические системы, о которых уже говорилось раньше, участвуют (или могут участвовать) в регуляции роста, дифференцировки и развития.

МОРФОГЕНЕЗ ФАГА Т4¹

Геном фага Т4 несет информацию для образования нескольких белков (см. главу 35). Некоторые генные мутации могут приводить к образованию измененных белков. Часть этих измененных белков функционирует в клетках хозяина, растущих при нормальной температуре (около 25° С), так же или почти так же хорошо, как и нормальные белки дикого типа. Однако они инактивируются в клетках, растущих при более высоких температурах (около 40° С). В случае оксиметилазы дезоксидитидиловой кислоты (ДОМЦаза) было найдено два типа таких мутантов, чувствительных к температуре (*ts*) (рис. 35 — 1 и стр. 463-464). Хотя у обоих мутантов при низких температурах наблюдается снижение активности ДОМЦазы по сравнению с диким типом, они по-разному отвечают на повышение температуры, при которой растут зараженные клетки хозяина. У одного из мутантов измененный фермент инактивируется вследствие тепловой денатурации в любой промежуток времени в процессе эклипсной фазы; у другого мутанта образующаяся измененная ДОМЦаза инактивируется только в том случае, если сдвиг температуры происходит до конца первой трети эклипсного периода; фермент устойчив, если температура повышается позднее. Эти результаты позволяют предполагать, что первый тип фермента может денатурироваться теплом после того, как он синтезируется, а второй чувствителен к температуре только во время синтеза.

Приблизительно для половины генов фага найдены *ts*-мутанты, являющиеся в действительности условно летальными. Эти гены были картированы, и их фенотипический эффект изучался на химическом, физиологическом и морфологическом уровнях. Результаты суммированы на рис. 26—4 (стр. 356). Мы видим, что кольцевой геном фага состоит из блоков, содержащих гены с общими функциями. Это следующие блоки:

| Мутанты | Характеристика |
|---------------|--|
| DO | Синтез ДНК не может начаться |
| DA | Синтез ДНК начинается, но быстро прекращается |
| DD | Синтез ДНК заторможен |
| «Нить хвоста» | Образуются частицы без нитей хвоста (в остальном нормальные) |
| «Головка» | Образуются частицы без головки (в лизатах присутствуют свободные «хвосты») |
| «Хвост» | Образуются частицы без «хвостов» или с неполноценными «хвостами» |

¹ Рассмотрение этого вопроса основано главным образом на работах Р. С. Эдгара, М. Суссман, Г. Денхардт, Л. Бойс и сотрудников (См. R. Epstein и др., 1964).

Эти результаты убедительно показывают, что гены в каждом блоке действуют в одно или почти в одно и то же время, а последовательность расположения различных блоков генов может отражать последовательность событий при репликации и созревании фага. По-видимому, локус тимидилатсинтетазы (стр. 463) составляет исключение (E. H. Simon a. I. Tessman, 1963), так как он находится непосредственно в той же области, что и гены нити «хвоста», а не в районе ранних генов, как этого следовало бы ожидать. Поскольку общее число генов в фаге, по-видимому, значительно превышает число структурных белков и ферментов, необходимых для образования фаговой ДНК (глава 35), то предполагается, что многие гены, не участвующие в образовании фаговой ДНК или белка, тем не менее играют роль в процессе морфогенеза частицы фага.

ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ АМФИБИЙ

Зиготное ядро оплодотворенной яйцеклетки лягушки можно удалить, пользуясь методами микрохирургии¹. Клетка без ядра не может нормально существовать, не может расти, делиться и дифференцироваться; поскольку у нее отсутствуют химические реакции, обеспечивающие эти функции, она в конце концов дегенерирует. Метаболическая неполноценность клетки вызвана удалением ядра, а не самой операцией. Об этом свидетельствует тот факт, что зигота ведет себя нормально, если ее прооперировать, но ядро оставить. Однако, еще более важно, что пересадка с помощью второй операции того же самого или подобного ядра восстанавливает жизнеспособность зиготы. Ядра, взятые на стадии бластулы, гаструлы и более поздних эмбриологических стадиях, можно пересадить в безъядерные зиготы. Такие эксперименты показывают, что чем позднее стадия, на которой находится пересаживаемое ядро, тем сильнее развитие отклоняется от нормы. Следовательно, ядра в процессе эмбриогенеза постепенно теряют способность обеспечивать полное, нормальное развитие.

Ядра одного вида лягушек можно пересадить в цитоплазму другого вида. Ядра *Rana pipiens*, которые размножались в цитоплазме яйцеклеток *R. sylvatica*, уже не могут обеспечивать гаструляции, если их пересадить обратно в цитоплазму яйцеклеток своего вида. Поскольку такая ограниченность ядерных потенций сохраняется при повторных переносах в безъядерную цитоплазму яиц (I. Moore, 1960), то мы можем сделать заключение, что функция хромосом может необратимо изменяться под действием цитоплазматических факторов (стр. 498).

Если ввести в зиготы небольшие количества разных белковых фракций (альбумина или гистона), полученных из клеток печени взрослых лягушек тех же видов, то деление клеток прекращается и развитие останавливается на стадии бластулы (C. Markert a. H. Ursprung, 1963). Приблизительно в это же время, на стадии бластулы, хромосомы оказываются необходимыми для дальнейшего развития. Хотя новые цитоплазматические рибосомы появляются только на поздних этапах стадии хвостовой почки, а образование новой РНК, по данным Д. Броуна и И. Кастона, впервые обнаруживается на стадии гаструлы, синтез белка (с помощью информационной РНК и рибосом, синтезированных до оплодотворения) начинается сразу же после оплодотворения.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ТРАНСКРИПЦИЯ

Сходство и различие нуклеиновых кислот в разных тканях мыши можно оценить по образованию двунитчатых структур, возникающих из однонитчатой ДНК или РНК и однонитчатой ДНК, заключенных в агар.

¹ Излагается на основании работ Р. Бриггса и Дж. Кинга.

Изучая конкуренцию между мечеными (радиоактивными) и немечеными (нерадиоактивными) молекулами, не удается показать разницы в полинуклеотидных последовательностях ДНК. Это наблюдение дает дополнительное доказательство в пользу того, что во всех соматических клетках содержится одинаковое количество ДНК. С другой стороны, обнаруживаются большие различия в популяциях молекул быстро синтезирующейся РНК, выделенной из разных органов. Этого и можно было ожидать, если предположить, что дифференцировка разных тканей связана с образованием разных типов молекул информационной РНК (В. Mc Carthy a. В. Hozer, 1964). Результаты других опытов по гибридизации РНК с ДНК показывают, что информационные РНК, соответствующие трем разным фазам роста *Bacillus subtilis*, образуются на разных локусах (R. Doi a. R. Igarashi, 1964); эти данные подтверждают представление о том, что в процессе морфогенеза идет транскрипция разных участков генома.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МИТОЗА

Примеры нарушения генетического контроля в процессе деления ядра и клетки можно найти среди мутантов кукурузы и дрозофилы, у которых в митозе изменена форма веретена (стр. 396); аллели, определяющие ориентацию веретена в митозе, известны также у улитки. Если в процессе дробления веретено ориентируется одним способом, то у улитки образуется раковина, закрученная вправо; когда же оно ориентируется другим способом, то получается раковина, закрученная влево. Однако сейчас мы ограничимся рассмотрением биохимического контроля митоза и, в частности, генетической основы этого контроля.

Микроспора лилий остается в интерфазе в течение нескольких недель. В этом случае активность тимидинкиназы возрастает к определенному времени и остается высокой в течение 24 часов. Это и другие наблюдения показывают (Y. Hotta a. H. Stern, 1963; H. Stern a. Y. Hotta, 1963), что тимидинкиназа присутствует в клетке не все время и образуется заново, обеспечивая репликацию ДНК перед митозом. Фермент распадается или инактивируется после того, как его функция заканчивается. Такая или инактивируется после того, как его функция заканчивается. Такая система с циклическими изменениями активности сходна с системами индуцированного синтеза ферментов у бактерий (стр. 471). Если бы удалось показать, что такая система регуляции является типичной, это означало бы, что многие процессы, идущие в интерфазе и в митозе, связаны с действием гена, активность которого регулируется циклически. Однако напомним (стр. 498), что в течение одной клеточной генерации далеко не все гены изменяют свою активность циклически.

РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ ВИРУСОМ

С помощью информационной РНК, образующейся при участии фагового генома, фаги могут регулировать, по крайней мере частично, рост и дифференцировку клеток бактерии-хозяина. В клетках, инфицированных вирулентными Т-четными фагами, материал, используемый для синтеза ДНК и белка хозяина, теперь идет на построение вирусных ДНК и белка. Умеренные фаги и различные эписомы также включают или выключают некоторые гены хозяина, в результате чего изменяется рост клетки и (или) ее дифференцировка. Опухолеродные вирусы (вирус полиомы и SV₄₀) могут вызывать наследственные изменения свойств фибробластов мыши, растущих в культуре. После заражения вирусом проявляются некоторые латентные свойства клеток. Например, в зараженных клетках восстанавливаются свойства клеток. Например, в зараженных клетках восстанавливаются свойства клеток.

ливается способность синтезировать коллаген, подавленная в незараженных клетках. Поэтому мы можем предположить, что в зараженных вирусом клетках некоторые репрессированные гены снова начинают действовать и что природа наблюдаемых клеточных трансформаций носит функциональный, а не мутационный характер (N. Sueoka a. T. Капо-Sueoka, 1964; G. Todaro, H. Green a. B. Goldberg, 1964).

ГИБРИДИЗАЦИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

В культурах клеток, а иногда и *in vivo*, одноядерные клетки, зараженные вирусом (кори, ветряной оспы, герпеса и некоторыми миксовирусами), могут сливаться с незараженными клетками, образуя гигантские многоядерные клетки, которые содержат тысячи ядер. Этот процесс называют *поликариоцитозом*. Считается, что слияние клеток связано с изменением их поверхности после заражения вирусом. В поликариоцитах ядра образуют общий сгусток (B. Roizman, 1962).

В некоторых штаммах клеточных культур из ткани мышей хромосомы обладают характерными морфологическими особенностями. Если смешать несколько таких линий и выращивать их вместе, то наблюдается образование одноядерных гибридных клеток, число хромосом которых вначале равно примерно сумме чисел хромосом в двух родительских линиях. В этих клетках находятся хромосомы, морфология которых характерна как для одной, так и для другой линии (B. Ephrussi a. S. Sorieul, 1962). Через несколько месяцев в клонах этих гибридных клеток наблюдается уменьшение числа хромосом, вероятно, в результате нерасхождения. Неизвестно, какова частота *гибридизации соматических клеток* у млекопитающих *in vivo*. Однако один такой случай был описан у телят (W. Stone, J. Friedman a. A. Fregin, 1964; H. Harris a. I. Watkins, 1965). В этом случае у каждого из двух близнецов имел место мозаицизм эритроцитов, так как они оба обладали тканями, которые различались генетически и продуцировали кровяные клетки с разными антигенными свойствами. В 3-летнем возрасте у одного из близнецов 10% клеток крови обладало его собственным генотипом, а 90% клеток крови имели генотип другого близнеца. Однако в возрасте 8 лет этот близнец имел три типа клеток крови: два «родительских» типа, на каждый из которых приходилось по 2%, и один «гибридный» тип, в который входило 96% всей популяции клеток.

Известно, что у нитчатых грибов, *Aspergillus* и *Penicillium*, происходит *гибридизация соматических клеток* (G. Pontecorvo, 1958). Эта *парасексуальность* проявляется в образовании диплоидных ядер в результате редких, возможно случайных слияний ядер многоклеточного мицелия, содержащего гаплоидные ядра. Образовавшиеся диплоидные ядра размножаются бок о бок с гаплоидными ядрами, и во время митоза в результате перекреста и (или) нерасхождения происходит потеря хромосом или «расщепление».

Дальнейшее изучение *гибридизации соматических клеток* и последующего расщепления хромосом может дать ценные сведения о процессе дифференцировки.

РНК И АНТИТЕЛА

Образование антител у крыс включает следующие стадии (G. Nossal, 1964). Молодые *плазмабласты*, которые делятся приблизительно каждые 10 часов, содержат свободно плавающие рибосомы и плохо развитую эндоплазматическую сеть. После контакта с антигенами эти клетки начинают с большой скоростью синтезировать рибосомы и мРНК, и в них

быстро образуется эндоплазматическая сеть. Каждый плазмабласт делится последовательно примерно 9 раз (каждое последующее деление длится дольше предыдущего), образуя клон зрелых *плазматических клеток*, не способных делиться. Если плазмабласты образуют большое количество разных белков (главным образом структурных белков и ферментов) и РНК, то в зрелых плазматических клетках синтезируется в основном белок, 90—95% которого составляют антитела. Ядро плазматической клетки сжимается и уплотняется, а ядрышки исчезают.

Первые молекулы антител, образовавшиеся в данной клетке, имеют молекулярный вес около миллиона (19s); позднее образуются более мелкие молекулы, с молекулярным весом 160 000 (7s). Мелкие антитела — это γ -глобулины с константой седиментации 7s. Они представлены тетрамерами, содержащими две идентичные В-цепи с молекулярным весом 20 000 и две идентичные А-цепи с молекулярным весом 50 000—60 000. За редким исключением каждая клетка образует антитела одного типа; плазматическая клетка лимфатических узлов синтезирует разные антитела. Неизвестно, каким образом антитела освобождаются из клетки, для того чтобы нейтрализовать антиген. Поскольку антиген не входит в клетку, образующую антитело (или входит, но в очень небольших количествах), то можно предположить, что простого контакта его с поверхностью клетки достаточно для того, чтобы клетка начала синтезировать антитела. Сейчас еще слишком рано говорить о том, какую непосредственно роль играют антиген и генотип в образовании специфических антител.

РНК ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И ОБУЧЕНИИ

Введение РНК или компонентов, содержащих РНК, в растущую клетку может вызвать изменения, подобные тем, которые происходят в клетке при развитии. Несмотря на то что клетки асцитной опухоли мыши *in vitro* не образуют сывороточного альбумина, они начинают синтезировать этот белок после инкубации с РНК, выделенной из нормальной печени мыши или телянка. С помощью РНК можно индуцировать в нескольких линиях раковых клеток синтез таких ферментов, как триптофанпирролаза и глюкозо-6-фосфатаза (M. Niu, C. Cordova, L. Niu a. C. Radbill, 1962; A. Evans, 1964). Специфичность белка, синтезируемого клеткой-реципиентом, близка или идентична специфичности белка той клетки, из которой была получена РНК. По-видимому, часть введенной РНК по крайней мере в течение часа функционирует как информационная РНК.

Если реакция на внешние воздействия не сводится к обучению, то в нейронах крысы может увеличиться количество ядерной РНК, но состав ее не меняется. Однако, если крыс начинают обучать, то не только увеличивается количество ядерной РНК, но также возрастает отношение А : У, а содержание Ц падает. Содержание и состав РНК в отдельных нейронах коры головного мозга можно изучать у крыс, которых заставляют доставать корм левой лапой, если они раньше пользовались правой. В нейронах, участвующих в обучении, не только увеличивается содержание РНК, но и возрастает отношение $\frac{A+G}{C+U}$, а отношение $\frac{G+C}{A+U}$ падает по сравнению с контрольными нейронами, находящимися в контрлатеральной части коры головного мозга. Одно из заболеваний нервной системы, паркинсонизм, приводит к сильным изменениям в составе РНК нервной ткани; в некоторых случаях вмешательство в ход синтеза РНК в мозговой ткани нарушает процесс обучения крыс. Эти факты убедительно показывают, что обучение связано с образованием информационной РНК (H. Hyden a. E. Egyhazi, 1963, 1964).

Синтез РНК и белка можно стимулировать эстрогенами (в ткани матки); тестостероном (в предстательной железе); гормоном цветения, по-видимому, представляющим собой стерол (в бутонах). Гормон цветения также снижает отношение гистон:ДНК. Это дает основание предполагать, что стероиды удаляют гистон из хроматина (J. Bonner a. P. Ts'o на стр. 510; T. Hamilton, 1964). В бесклеточной системе, приготовленной из печени крысы, низкие концентрации тироксина стимулируют включение аминокислот в белок. Этот эффект зависит от присутствия митохондрий и окисляемого субстрата и не зависит от РНК-полимеразы и синтеза мРНК; по-видимому, влияние тироксина проявляется на стадии переноса аминокислоты с аминоацил-ТРНК на рибосомы, синтезирующие белок (L. Sokoloff, C. Francis a. P. Campbell, 1964).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА У ПАРАМЕЦИИ

Парамеция обычно представляет собой одноклеточное животное (*синглет*), однако встречаются и двойные особи (*дублеты*) (T. Sonneborn, 1963, 1964). Синглетный и дублетные типы очень хорошо воспроизводятся в последующих поколениях. Дублет может также конъюгировать с двумя синглетами, и каждый синглетный эксконъюгант закономерно дает клон синглетов, а дублетный эксконъюгант — клон дублетов. Различие между синглетами и дублетами не определяется генами микронуклеуса, так как эксконъюганты в этом отношении идентичны. Тот же фенотип получается даже в том случае, когда цитоплазматический мостик сохраняется достаточно долго, чтобы мог произойти обмен цитоплазмой. Следовательно, различие между дублетом и синглетом не обусловлено каким-либо цитоплазматическим компонентом, который может свободно мигрировать. Другие данные, по-видимому, исключают и возможность того, что здесь может играть роль макронуклеус. Единственный компонент клетки, который мог бы определять эти свойства, — это *кортекс* — неподвижный наружный слой эктоплазмы, толщиной 0,5 мк.

В одном опыте после образования цитоплазматического мостика между синглетом и дублетом был обнаружен редкий свободный синглетный эксконъюгант, несущий лишние участки кортекса. У дублетного эксконъюганта была заметна соответственно брешь в кортексе. Позднее у синглета этот лишний участок кортекса расплывается, а после деления одна из двух дочерних клеток дает клон с фенотипом, промежуточным между синглетным и дублетным. Такая естественная пересадка только очень небольшой части орального участка приводит к возникновению линии, обладающей вторым целым оральным сегментом, включая наружное преддверие, рот и глотку. Другие исследования показывают, что получаемые в опыте различные изменения кортикальной организации сохраняются в процессе деления клетки, а некоторые видимые кортикальные структуры, если они изначально отсутствовали, не могут возникнуть *de novo*.

Перечисленные факты подтверждают важную роль кортекса в дифференцировке. Однако кортекс не является здесь совершенно автономным, так как известно, что некоторые ядерные гены определяют видимые кортикальные структуры или их морфогенез. Как уже отмечалось, небольшие добавочные кусочки кортекса могут вызывать в нем сильные изменения. Следовательно, природа и действие кортекса зависят не только от его собственного состава, но и от ядерных генов и их продуктов, а также от общего метаболизма клетки. Следует отметить, что в мембранах эритроцитов человека была обнаружена двунитчатая ДНК (L. Philipson a. O. Zetterqvist, 1964). Эта ДНК имеет молекулярный вес около 10^6 ; содержание Г + Ц составляет в ней приблизительно 39—42%. Ее одно-

родность (а также возможно и высокое отношение $\frac{A+T}{G+C}$) позволяет считать, что это не просто случайно адсорбированная ДНК. В настоящее время можно только в общих словах, в основном умозрительно описывать функцию кортекса. «Значительно более трудная задача будущего заключается в определении молекулярной природы важнейших структур, градиентов и систем, отвечающих на различные воздействия, а также в выяснении того, каким образом специфическое всасывание, ориентация и активация мигрирующих молекул приводят к зримому морфогенезу и стабильной клеточной организации, определяемой генетически» (Т. М. Sonneborn, 1963).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтез зрелых частиц в потомстве фага Т4 регулируется генами вируса-родителя, которые действуют одновременно или почти одновременно. Эти гены на кольцевой карте сцепления располагаются в последовательности, отражающей последовательные стадии морфогенеза фага.

Генетические и молекулярные основы дифференцировки и развития раскрываются в опытах по пересадке ядер, при изучении гибридизации соматических клеток, взаимодействия антиген-антитело, а также в биохимических исследованиях эмбриогенеза.

Исследования тимидинкиназы свидетельствуют о том, что митоз можно считать результатом циклического проявления действия гена. РНК со специфическим составом участвует внутри клетки в обучении, а также играет определенную роль в межклеточных взаимодействиях в процессе дифференцировки. Стероиды, по-видимому, участвуют в образовании РНК и в распределении гистонов.

Опыты с парамециями указывают на важную роль кортекса в процессах дифференцировки, хотя химический механизм его влияния остается неизвестным. Эти опыты показывают, что морфогенез зависит как от генетического материала ядра, так и от протоплазмы и состояния обмена веществ.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

41.1. Примените концепцию оперона к развитию фага Т4.

41.2. Опыты с пересадками ядер, проведенные Бриггсом, Кингом и Муром, доказали, что в процессе развития иногда возникают необратимые изменения ядра. Можно ли такие изменения назвать мутациями? Объясните.

41.3. У улитки *Limnaea peregra* в результате самооплодотворения особей чистой линии, у которых раковина закручена вправо (дексиотропно), или влево (леотропно), образуется потомство, в котором раковины у всех особей закручены так же, как у родителей. Скрещивание дексиотропных самок с леотропными самцами дает целиком дексиотропное F_1 , от которого в результате самооплодотворения образуется также целиком дексиотропное F_2 . Однако после самооплодотворения $3/4 F_2$ дают дексиотропное F_3 , а $1/4 F_2$ — леотропное F_3 . При реципрокном скрещивании дексиотропных самцов с леотропными самками все потомство F_1 является леотропным. F_1 дает F_2 и F_3 , фенотипически сходные с F_1 . Дайте генетическое объяснение этим результатам. Участвуют ли здесь цитоплазматические гены? Объясните.

41.4. Т. Ямада обнаружил, что ткань, способная образовывать эктодерму, после выделения и культивирования в стандартной среде *in vitro* дает только клетки эпидермиса, но после добавления в среду белковой

фракции костного мозга образует мезодермальные ткани. Как Вы можете расценить эти результаты?

41.5. Почему при росте *in vitro* хондроциты хряща позвоночника дедифференцируются?

41.6. Приведите обоснование следующего утверждения Эберта (1963): «Главный вопрос, лежащий в основе современной эмбриологии, заключается в изучении генетики развития. Во второй половине XX столетия молекулярная эмбриология становится четким логическим продолжением молекулярной генетики».

41.7. Какие выводы Вы можете сделать на основании следующих данных, касающихся распространения синдрома Дауна в одном из районов Австралии: сфера распространения синдрома варьирует год от года, вспышки наблюдаются приблизительно каждые 5 лет; около 40% случаев приходится на определенные географические районы, а именно заболевание чаще встречается в городских районах, чем в сельских.

ЛИТЕРАТУРА

- Cytogenetics and Developmental Genetics.— Amer. Zool., 1963, 3, 1.
- M. Demerec. Clustering of functionally Related Genes in *Salmonella typhimurium*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 41, 1057.
- Differentiation and Development. Boston, J. Exp. Zool., 1964, N 1, 157.
- R. H. Doi and R. T. Igarashi. Genetic Transcription during Morphogenesis.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 755.
- B. Ephrussi and S. Sorieul. Mating of Somatic Cells in Vitro. In: «Approaches to the Genetic Analysis of Mammalian Cells», D. J. Merchant and J. V. Neel (Eds.). Ann. Arbor, 1962, p. 81.
- R. H. Epstein and others. Physiological Studies of Conditioned Lethal Mutants of Bacteriophage T4D.— Cold Spring Harbor. Sympos. Quant. Biol., 1964, 28, 375.
- A. H. Evans. Introduction of Specific Drug Resistance Properties by Purified RNA — Containing Fractions from *Pneumococcus*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1442.
- T. H. Hamilton. Sequences of RNA and Protein Synthesis During Early Estrogen Action.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 83.
- H. Harris and J. F. Watkins. Hybrid Cells Derived from Mouse and Man: Artificial Heterocaryons of Mammalian Cells from Different Species.— Nature, 1965, 205.
- Y. Hotta and H. Stern. Molecular Facets of Mitotic Regulation. II. Factors Underlying the Removal of Thymidine Kinase.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 861.
- H. Hydén and E. Egyhazi. Glial RNA Changes During a Learning Experiment in Rats.— Proc. Nat. Acad. Sci., U. S., 1963, 49, 618.
- H. Hydén and E. Egyhazi. Changes in RNA content and Base Composition in Cortical Neurons of Rats in a Learning Experiment Involving Transfer of Handedness.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1030.
- M. Locke (Ed.). Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis. N. Y. 1963.
- C. L. Markert and H. Ursprung. Production of Replicable Changes in Zygote Chromosomes of *Rana pipiens* by Injected Proteins from Adult Liver Nuclei.— Develop. Biol., 1963, 7, 560.
- B. J. McCarthy and B. H. Hoyer. Identity of DNA and Diversity of Messenger RNA Molecules in Normal Mouse Tissues.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 915.
- W. D. McElroy and B. Glass (Eds.). A Symposium on the Chemical Basis of Development. Baltimore, 1958.
- J. A. Moore. Serial Back-Transfers of Nuclei in Experiments Involving Two Species of Frogs.— Develop. Biol., 1960, 2, 535.
- M. C. Niu, C. C. Cordova, L. C. Niu and C. L. Radbill. RNA.— Induced Biosynthesis of Specific Enzymes.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1964.
- G. J. V. Nossal. How Cells Make Antibodies.— Societ. Amer., 1964, N 211, 106.
- L. Philipson and O. Zetterqvist. The Presence of DNA in Human Erythrocyte Membranes.— Biochim. Biophys. Acta, 1964, 91, 171.
- B. Roizman. Polykaryocytosis Induced by Viruses.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 228.
- L. Sokoloff, C. M. Francis and P. L. Campbell. Thyroxine Stimulation of Amino Acid

Incorporation into Protein Independent of Any Action on Messenger RNA Synthesis.—
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 1964, 52, 728.

T. M. Sonneborn. Does Preformed Cell Structure Play an Essential Role in Cell Heredity?
In: «The Nature of Biological Diversity»; Allen J. M. (Ed.). N. Y., 1963, p. 165.

T. M. Sonneborn. The Differentiation of Cells.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51,
915.

H. Stern and Y. Hotta. Regulated Synthesis of RNA and Protein in the Control of Cell
Division. —Brookhaven Sympos. Biol., 1963, 16, 59.

W. H. Stone, J. Friedman and A. Fregin. Possible Somatic Cell Mating in Twin Cattle
with Erythrocyte Mosaicism.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 1036.

N. Sueoka and T. Kano-Sueoka. A. specific Modification of Leucyl-sRNA of *Escherichia*
coli after T2 Infection.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 52, 1535.

Symposium on Macromolecular Aspects of the Cell Cycle.— J. Cell. Comp. Physiol.,
1963, 62 (Suppl. LI).

G. J. Todaro, H. Green and B. D. Goldberg. Transformation of Properties of an Established
Cell Line by SV40 and Polyoma Virus.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1964, 51, 66.

Уоддингтон К. Морфогенез и генетика, М., изд-во «Мир», 1964.

E. Weiler. Immunologically Determined and Competent Cells Are Affected Differently
by Actinomycin D.—Science, 1964, 144, 846.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

При рассмотрении природы генов и их действия не был затронут вопрос о происхождении и эволюции генетического материала. Прежде чем перейти к этому вопросу, следует снова рассмотреть природу известных сейчас типов генетического материала — ДНК и РНК.

Репликация нуклеиновых кислот обоих типов осуществляется с помощью однонитчатого или двунитчатого полинуклеотида, служащего матрицей для комплементарных мономеров, которые затем соединяются, образуя комплементарные полинуклеотиды. Свойства нуклеиновой кислоты, ответственные за матричную функцию, должны определять специфическую физическую конфигурацию линейно расположенных мономеров, а также специфический характер распределения электрических зарядов. Функция полинуклеотидной цепи как матрицы при образовании комплементарной цепи представляется относительно пассивной; активным процессом следует считать действие высоко специфической полимеразы или синтетазы нуклеиновой кислоты. Поскольку нить нуклеиновой кислоты, служащая матрицей, в основном пассивна, то не удивительно, что нуклеиновая кислота может использоваться разными ферментами в качестве матрицы, если исходные строительные блоки, собранные на матрице, имеют соответствующие физические и электрические свойства. Известны примеры, когда нуклеиновые кислоты используются в качестве матрицы для синтеза некомплементарных полимеров: зависящая от ДНК РНК-полимераза образует РНК на ДНК, а РНК может быть *in vivo* и *in vitro* матрицей для синтеза ДНК. Остается неясным, служит ли нуклеиновая кислота матрицей для нуклеотидов, не содержащихся в ДНК и РНК, а также для других веществ. (Отметим, что в нуклеопротеидах связь основных белков с нуклеиновыми кислотами может обеспечиваться, по крайней мере частично, матричным механизмом.) Поэтому наиболее простая и всеобъемлющая рабочая гипотеза предполагает, что все функциональные свойства гена зависят от линейной последовательности нуклеотидов и от того, каким образом разные вещества и ферменты используют этот полинуклеотид как матрицу; другими словами, *матричная функция — это единственная функция генетического материала*.

Процесс самовоспроизведения нуклеиновой кислоты, очевидно, не укладывается в одну стадию; по-видимому, две репликации необходимы для того, чтобы данная нить удвоилась. Первая репликация дает комплементарную нить; вторая репликация образует копию первой нити. Такое представление о способе самовоспроизведения нуклеиновой кислоты можно считать оправданным по следующим причинам:

1) самовоспроизведение однонитчатых вирусных ДНК и РНК следует считать двухступенчатым процессом;

2) двунитчатая нуклеиновая кислота может обеспечивать предпочтительное или исключительное образование только одной из комплементарных нитей;

3) одна из двух нитей двойной спирали может быть дефектной (мутантной) и неспособной, по крайней мере в некоторых местах, к репликации и самовоспроизведению; тем не менее, нормальная, комплементарная ей цепь может осуществлять обе функции.

Следовательно, теперь мы можем определить *генетический материал* как некую матрицу, функционирование которой приводит в конце концов к ее самовоспроизведению и которая или сохранила эту способность после мутации, или же является мутантной матрицей, обладающей этой способностью. Мы можем также рассматривать в качестве генетического материала любое вещество, которое дает такие же фенотипические эффекты, как уже известный генетический материал.

Можно ли чистую ДНК *in vitro* считать генетическим материалом? При первоначальном рассмотрении опознание генетического материала зависело от его присутствия в организмах и от фенотипического эффекта, которым он обладал; теперь мы можем обойтись без этих требований. Чистую вирусную ДНК в пробирке для опыта можно было бы считать генетическим материалом, хотя она находится вне организма, и не рекомбинирует, не мутирует, не реплицируется и не участвует в образовании фенотипа. Это утверждение основывается на том, что такая ДНК может обладать генетическими свойствами после введения в организм. ДНК, синтезированная *in vitro*, физически и химически почти идентична хромосомной ДНК. Эта ДНК способна:

- 1) к воспроизведению самой себя и некоторых собственных разновидностей;
- 2) к разделению цепей и рекомбинации;
- 3) к созданию определенного фенотипического эффекта в результате генетической трансформации.

Поэтому мы можем заключить, что синтезированная *in vitro* ДНК также удовлетворяет требованиям, предъявляемым данным выше определением генетического материала.

Самый простой биологический синтез ДНК или РНК требует присутствия нуклеозидтрифосфатов, фермента (ДНК-полимеразы или РНК-синтетазы) и воды, содержащей при соответствующем рН ионы, необходимые для активации фермента. Маловероятно, чтобы впервые возникший генетический материал обладал этими многочисленными и специфическими требованиями, необходимыми для репликации. Можно предположить, что впервые возникший в процессе эволюции и успешно работающий генетический материал был ближе к РНК, чем к ДНК. Правда, ДНК (благодаря отсутствию О в положении 2') как матрица стабильнее РНК; однако именно полирибонуклеотид типа РНК (ТРНК) служит переносчиком аминокислот. Эта способность переносить аминокислоты могла привести к синтезу полимераз, необходимых для быстрого синтеза гена, и к синтезу других белков (включая ферменты), которые стабилизируют и сохраняют химическую целостность генетического материала.

Предшествующие рассуждения приводят к постановке вопроса о происхождении генетического материала на Земле. Существовали ли нуклеиновые кислоты и белки на ранних стадиях генетической эволюции? Соответствует ли появление этих веществ на ранних стадиях эволюции нашим знаниям о ходе химической эволюции на Земле?

ЭРЫ ХИМИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ ¹

Эра I. Теперь мы знаем, что на ранней предбиологической стадии около четырех миллиардов лет тому назад атмосфера Земли обладала восстаивающими свойствами и была богата водой, водородом, метаном и аммиаком, но содержала мало кислорода и углекислого газа. В лаборатории удается получить большое число простых радикалов и органических молекул, воздействуя на смеси этих и подобных им веществ следующими источниками энергии: электрические разряды, солнечный и ультра-

¹ Г. Гаффон. В кн. «Горизонты биохимии», 1962.

фиолетовый свет, радиоволны сверхвысокой частоты, ультразвук, тепло, электроны высоких энергий, рентгеновы лучи и протонное излучение. Более того, летящий в газе или жидкости снаряд может вызвать образование большого числа сложных химических соединений; очень вероятно, что в предбиологическую эпоху метеориты также индуцировали хемосинтез (А. Hochstim, 1963). Следующие соединения можно синтезировать экспериментально в «первобытной» атмосфере: аланин, глицин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, пропионовую кислоту, молочную кислоту, янтарную кислоту, некоторые жирные кислоты, мочевины, некоторые сахара, фосфорную кислоту, аденин и урацил. Хотя мы все еще не можем определить, какие источники энергии первоначально участвовали в таком синтезе, нет сомнений в том, что синтез и накопление самых разнообразных органических молекул происходили тогда в океанах с образованием «органического супа». В течение этой эры, продолжительность которой не установлена, большая часть свободного водорода исчезла из земной атмосферы.

Эра II. Атмосфера по-прежнему обладала восстанавливающими свойствами, но содержала только следы свободного кислорода. В течение этой эры, как и в течение эры I, в хемосинтезе первоначально участвовали те же источники энергии. Как только следы кислорода попадали в атмосферу, ультрафиолетовые лучи Солнца превращали его в озон. Озон поглощает ультрафиолетовый свет; поэтому слой озона в атмосфере действовал как покрывало, так что основная хемосинтетическая энергия Солнца складывалась из энергии видимого света и тепловой энергии.

Сравнительная биохимия показывает, что в состав всех ныне существующих высших растений и животных, бактерий и многих вирусов входят примерно одни и те же аминокислоты числом около 20. Белок и нуклеиновая кислота оказались, по-видимому, наиболее стойкими химическими соединениями на Земле, существуя уже более миллиарда лет. При нагревании в присутствии избытка аспарагиновой и глутаминовой кислот, при температуре не более 200° C (S. Fox, 1960, 1964) аминокислоты в безводной среде могут полимеризоваться в *протеиноиды* — полимеры, состоящие из связанных пептидной связью всех (или большей части) аминокислот, встречающихся в белках. Протеиноиды представляют собой линейные полимеры с молекулярным весом до 10 000. Они обладают слабой каталитической активностью и большей частью неотличимы от естественных белков или полипептидов такого же размера. Протеиноиды не обладают антигенными свойствами. В горячей воде они могут образовывать сферы около 2 мк диаметром. Эти сферы набухают или сжимаются в среде при изменении концентрации хлористого натрия, напоминая объекты, обладающие осмотическими свойствами. Иногда в таких микро-сферах происходит процесс, сходный с делением, и на электронных микрофотографиях можно видеть двуслойную наружную мембрану. С помощью нагревания аминокислот в безводной среде могут быть получены их гомополимеры и сополимеры.

Основываясь на этих данных и высказанных выше соображениях, можно предполагать, что в течение эры II были синтезированы сложные органические вещества: полипептиды, нуклеотиды, каротины, полифосфаты, пигменты и порфирины. Предполагается также, что адсорбция и первобытный катализ происходили на полипептидах или на поверхности различных глин.

Эра III. Предполагается, что в эту эру существовали в основном анаэробные условия, а в атмосфере были только следы свободного кислорода и углекислого газа. Считается, что в течение этого периода на поверхностях больших органических молекул эволюционировали синтетические циклы (это касается специфического катализа и фотохимических процессов). На последней стадии эволюции в течение этой эры возникли также

примитивные ферменты и гены, что привело к образованию первого организма.

Некоторые последние исследования и предположения (А. Рич в кн. «Горизонты биохимии», 1962) могут пролить свет на вопросы, касающиеся эволюции и взаимосвязи полинуклеотидов и белков. Как уже отмечалось, белки и моонуклеотиды, по-видимому, уже присутствовали в начале эры III. В присутствии обезвоживающих агентов происходило удаление воды, и нуклеотиды соединялись с образованием полинуклеотидов, молекулярный вес которых достигал 50 000. Заметьте, что такой полимер образуется без участия фермента. Скорость такого неферментативного синтеза полиуридиловой кислоты увеличивается более чем в 10 раз в присутствии полиадениловой кислоты (G. Schramm, H. Grötsch, W. Pollmann, 1961). Это позволяет предполагать, что последний гомополимер может служить матрицей в процессе неферментативного синтеза первого гомополимера. Предложена гипотетическая схема образования ДНК в результате реакций глицеринового альдегида, уксусного альдегида, аммиака, щавелевоуксусной кислоты, глицина и формильных группировок.

Молекулярная эволюция ведет не только к усложнению, но и к стабилизации молекул. Следовательно, отдельные белковые и полинуклеотидные цепи могут соединяться с образованием более стабильного комплекса. (Мы знаем, что образование комплекса ДНК — гистон стабилизирует ДНК; двунитчатость и полнотенность также, по-видимому, стабилизируют эту нуклеиновую кислоту.) Образование комплекса белок — нуклеиновая кислота не обязательно должно начинаться в результате взаимодействия белка и полинуклеотида. Могли существовать единицы один нуклеотид — одна аминокислота, которые полимеризовались, образуя сначала полипептид, а потом полинуклеотид, или наоборот. Независимо от способа образования комплекса нуклеиновая кислота — белок такой комплекс должен был уже содержать в себе *примитивный код, с помощью которого нуклеотиды и аминокислоты кодировали друг друга*. Так как нуклеиновые кислоты дают более удобные матрицы для репликации, чем белки, то генетическим материалом стала нуклеиновая часть нуклеопротеида. В результате химической эволюции число нуклеотидов, определяющих одну аминокислоту, увеличилось с одного до трех — до размера кодона наших дней.

Даже если эволюция белков и полинуклеотидов шла некоторое время независимо, несомненно, что дальнейшая эволюция этих двух веществ тесно связана. Исходя из относительной химической инертности нуклеиновых кислот, мы можем предположить, что первый основной результат их эволюции заключался в стабилизации огромного числа белковых молекул и ферментативных циклов, которые возникли в течение эры III; второй основной результат эволюции нуклеиновых кислот заключается в том, что белки стали воспроизводиться с помощью рибонуклеиновой кислоты. Другими словами, *химическая эволюция представляется в основном как эволюция белка, в процессе которой нуклеиновые кислоты начали стабилизировать белки и стали матрицами для синтеза белка*. Такая эволюция могла бы произойти, если бы нуклеиновые кислоты сначала образовались в среде, основным органическим компонентом которой был бы белок. В основные составляющие компоненты нуклеиновых кислот не входит сера (и многие другие элементы); поэтому нуклеиновые кислоты лишены той потребности в химической стабилизации, которая свойственна белкам. Дальнейшее увеличение стабилизации белков было достигнуто, вероятно, за счет того, что информация сохранилась уже в ДНК, а не в РНК. Функции РНК становились все более и более узкими, сосредоточиваясь на процессе трансляции. После возникновения транскрипции и трансляции, несомненно, стало выгодно увеличить скорость этих реакций с помощью ферментов, полимеризующих нуклеиновую кислоту.

Возникла необходимость защитить нуклеиновые кислоты от перекисей, образующихся в окружающей среде под действием радиации. Весьма вероятно, что нуклеиновые кислоты, которые кодировали каталазу, защищали нуклеиновую кислоту непосредственно, а синтез белка — косвенно. Химическую эволюцию (предбиологическую и биологическую) часто рассматривают, исходя из структуры и функции белков. Поэтому высказанное здесь мнение о том, что генетические нуклеиновые кислоты играли в эволюции меньшую роль, уже неоригинально и широко принято. Вспомогательная роль нуклеиновых кислот у ныне живущих организмов проявляется не только в том, что ГТФ необходим для синтеза белка, а АТФ для переноса энергии, но также и в том, что УТФ и ЦТФ используются в транспорте мономеров и в синтезе углеводов и липидов (R. Eakin, 1963).

Существование тесной взаимосвязи между аминокислотами и генетическим материалом обязывает нас знать больше об эволюции всех типов органических соединений, особенно соединений, богатых энергией (например, АТФ), катализаторов (железосодержащих соединений) и веществ типа хлорофилла, способных улавливать энергию.

Рассматривая вопрос о происхождении первого гена, надо помнить о том, что его «негенетический» предок должен был в какой-то степени обладать способностью к самовоспроизведению, но не мог воспроизводить ни одну из его мутантных форм. Получение сведений о негенетических системах, обладающих частью, но не всеми свойствами генетического материала, крайне необходимо и желательно.

Субгенетические вещества могут существовать и в ныне живущих клетках. Некоторые содержащие ДНК компоненты цитоплазмы могут самовоспроизводиться. Сюда относятся хлоропласты, митохондрии, центриоли и кинетосомы. Если ДНК в этих структурах может мутировать и после этого еще способна к самовоспроизведению, то ее можно рассматривать как цитоплазматический или внеядерный генетический материал. Можно надеяться, что экспериментальное исследование этих органелл позволит раскрыть подробности их химического строения. Мы хотели бы знать гораздо больше о том, как синтезируются гены, состоящие из РНК; как РНК-метагон парамеции размножается в *Didinium*; способна ли эта РНК к самовоспроизведению после мутации. Получив ответы на эти вопросы, можно было бы более плодотворно размышлять о природе как «предгенетического», так и первозданного генетического материала.

Эры IV и V. Здесь условия окружающей среды вначале были, по-видимому, в основном такими же, как и в течение эры III. Однако позднее содержание в атмосфере углекислого газа увеличилось, затем уменьшилось, и весьма сильно увеличилось содержание свободного кислорода. Мы еще не можем точно решить, какими путями шла химическая эволюция первого гена; однако мы располагаем некоторыми данными, относящимися к последующей истории генов в организмах. Ныне у свободно живущих организмов единственным генетическим материалом служит ДНК; это вещество обнаруживается у всех организмов: у одноклеточных и многоклеточных, у растений, животных и микроорганизмов. Мы не знаем, существовали ли когда-либо гены, не состоящие из ДНК или РНК. Тем не менее, гены, состоящие из ДНК, должны были иметь определенные преимущества при выживаемости организмов: ведь в конце концов именно они оставались главным генетическим материалом на протяжении примерно миллиарда лет, т. е. приблизительно с момента расхождения эволюционных путей растений и животных. Вероятно, образование политенных хромосом с теломерами и центромерами, а также возникновение специальных способов разделения дочерних и гомологичных хромосом (с помощью митоза и мейоза) можно расценивать как совершенно новые способы функционирования ДНК, которая существовала уже некоторое время до того, как образовались растительное и животное царства.

Эволюция должна была привести к способности транскрибировать только одну из двух комплементарных полинуклеотидных цепей, в результате чего могла возникнуть комплементарная РНК и вирусы с однонитчатыми нуклеиновыми кислотами. Так мог возникнуть генетический код и аппарат трансляции. Организм должен был содержать какое-то количество ДНК и основных белков, которые регулировали бы генетическую активность; должны были также возникнуть вещества, регулирующие мутабельность.

У нас есть основания полагать, что происходила также эволюция генетической активности. Возможно, что на первозданной Земле до появления первых организмов, содержащих гены, накапливались и сохранялись большие количества различных, более или менее сложных органических соединений. Поскольку же эти организмы использовали их в обмене веществ, то должен был происходить отбор мутантов, способных синтезировать именно эти органические вещества из более простых органических или неорганических соединений (N. Horgowitz, 1945). Согласно этой гипотезе, естественный отбор способствовал накоплению мутантных генов, определяющих синтез соединений, которых больше не было в окружающей среде. Независимость от окружающей среды должна была бы также усиливаться в результате физического сцепления генов, участвующих на разных последовательных стадиях данного биохимического процесса. Эта независимость в конце концов должна была привести к отбору мутантных генов, функция которых заключалась бы не только в самовоспроизведении, но и в регуляции функционирования других генов. Таким образом, кроме структурных генов, в процессе эволюции могли образоваться регуляторные гены — гены-операторы и гены-регуляторы, а также гены, необходимые для синтеза специфических основных белков, участвующих в регуляции спирализации, репликации и функционирования хромосом.

КОСМИЧЕСКАЯ ХЕМОЭВОЛЮЦИЯ

В поисках сведений, касающихся эволюции предгенетической (до появления организмов) или постгенетической (после появления организмов), не следует ограничиваться нашей планетой. Возраст Вселенной исчисляется примерно десятью миллиардами лет; Земля приблизительно вдвое моложе. Поскольку во Вселенной имеется бесконечное количество звезд (солнц) с планетами, то в ней должно находиться громадное число солнц такого же размера, как наше, а также планеты размером с Землю, находящиеся на сравнимых с Землей расстояниях от собственных солнц. Несомненно, что некоторые из этих планет могут быть моложе, а некоторые старше, чем наша планета. Какова возможность того, что химическая и биологическая эволюция, сходная с нашей, идет и на других планетах? Ответ на этот вопрос зависит, конечно, от химического состава этих планет.

Вселенная в основном состоит из водорода и гелия. (Как уже отмечалось, большая часть водорода Земли ушла из нашей атмосферы в течение Эры I.) Во Вселенной очень много кислорода и азота, и она богаче, чем Земля, углеродом, который входит в состав органических соединений, сыгравших столь существенную роль в химической и биологической эволюции на Земле. Поэтому весьма вероятно, что во Вселенной есть много мест, где могла успешно начаться химическая эволюция, представляющая интерес для биологов. Так как относительная бедность углеродом делает Землю не очень удачным местом для такой эволюции (которая тем не менее произошла), то тем больше оснований думать, что во Вселенной есть множество планет на ранних стадиях биологической эволюции, а также планет, более старых, чем наша, на которых могут находиться более совершенные типы организмов.

Были получены данные, показавшие, что в кометах присутствуют такие органические радикалы, как CN , CN , CC и CO , а на Марсе обнаружены асимметрические органические молекулы. Астрономы сообщали также о сезонных изменениях в окраске и структуре поверхности Марса. Это дает веские основания для предположения, что на Марсе, у которого атмосфера более разреженная, чем на Земле, имеются заметные количества органической материи, хотя мы еще не можем определить, существует ли она в форме живых организмов.

Дальнейшие сведения относительно химии нашего Солнца и его планет будут несомненно получены с помощью телескопов, вращающихся высоко в атмосфере Земли или вне ее. Теперь в планы межпланетных исследований входит посылка других приборов на разные планеты (или к этим планетам) нашей солнечной системы. Эти полеты могут быть использованы для выяснения точного химического состава соседних с нами планет и для поисков на них органических соединений, организмов, а также РНК и ДНК. Мы уже послали в космос радиосигналы с целью осуществить связь с другими организмами, способными их принять и даже ответить на них.

При любом космическом полете крайне важно избежать случайного переноса на другие планеты земных генотипов; если одна единственная бактерия, например клетка *E. coli*, будет помещена на планету с подходящей средой, то ее потомство в течение 2 суток займет объем, равный объему Земли. Такой перенос был бы несомненно губительным для всех будущих планов изучения эволюции органических соединений или каких-либо местных организмов. Чтобы гарантировать отсутствие такого загрязнения, объекты, посылаемые за пределы нашей атмосферы, стерилизуются. Следует также помнить, что удар ракеты о планету может вызвать образование органических веществ.

Какие небесные объекты, которые могут быть изучены в ближайшем будущем, представляют интерес с точки зрения исследования предбиологической эволюции и эволюции организмов? Мы уже упоминали Марс. Рассмотрим Венеру, поверхность которой не изучена и целиком закрыта непрозрачным слоем облаков, содержащим много углекислого газа и воды. Результаты приблизительных измерений температуры на Венере сильно варьируют (обычно считается, что ее поверхность сухая и горячая); мы можем предположить, что там уже появились органические соединения, даже если биологическая эволюция невозможна. Если после достаточно тщательного изучения Венеры мы захотим ее заселить, то прежде всего внесем в ее атмосферу какой-нибудь микроорганизм, содержащий хлорофилл. Используя для роста и размножения большие количества атмосферных компонентов, такой организм мог бы за короткое время коренным образом изменить климат Венеры.

На Луне, нашем собственном спутнике, нет атмосферы; по-видимому, там нет и воды. Поэтому пока не приходится говорить о присутствии там жизни, сходной с жизнью на Земле. Однако Луна может оказаться столь же древней, как и Земля; до того как утратить атмосферу, она могла быть ареной органической и даже биологической эволюции. Поэтому было бы интересно изучить образцы с поверхности Луны и в особенности из ее более глубоко залегающих слоев. Высказывалось предположение, согласно которому Луна действует в качестве гравитационной ловушки для скопаемых спор, блуждающих в межпланетном пространстве. Межпланетный перенос генов представляется неправдоподобным событием; тем не менее такая возможность слишком существенна для того, чтобы ее игнорировать при изучении и эксплуатации космоса. Исследования планет проводятся по многим причинам; к наиболее важным из них следовало бы отнести стремление получить сведения о химической эволюции, об эволюции ДНК и РНК, различных организмов и вообще жизни любого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На Земле некогда произошла химическая эволюция. Этот процесс привел к образованию большей части веществ и синтетических циклов, обнаруживаемых у ныне живущих организмов, а также к образованию белков, полинуклеотидов и нуклеопротеидов. Последние соединения эволюционировали до такой стадии, когда нуклеиновая кислота смогла воспроизводить самое себя, а также некоторые из своих модификаций, и стала, таким образом, генетическим материалом. На Земле химическая эволюция основывалась главным образом на эволюции белка, так как нуклеиновые кислоты обладают значительно меньшим химическим разнообразием; поэтому мы предполагаем, что эволюция нуклеиновых кислот (которая шла, по-видимому, от РНК к ДНК) была подчинена эволюции, направленной главным образом на стабилизацию белка и его синтез.

ДНК служит основным генетическим материалом на Земле уже в течение примерно миллиарда лет. За это время ДНК и связанные с ней вещества подверглись структурной эволюции, которая привела к появлению хромосом, механизмов генетической рекомбинации и регуляции мутабельности. По-видимому, гены подверглись также функциональной эволюции, которая заключалась в переходе от структурных генов (определяющих синтез и организацию негенетических веществ) к функциональным (регулирующим действие генов).

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

42.1. Как Вы думаете, что раньше возникло в эволюции: гены или то, что мы называем «продуктом гена»? Объясните.

42.2. Как Вы думаете, подвергся ли генетический материал биохимической эволюции? Структурной эволюции? Функциональной эволюции? Почему?

42.3. Как Вы думаете, есть ли на других планетах «сверхчеловек»? Почему?

42.4. Допускаете ли Вы, что в будущем нам непременно надо будет избегать загрязнений нашей планеты материалами с других планет точно так же, как мы теперь избегаем обратного? Почему?

42.5. Как могла бы измениться среда на Венере, если бы в ее атмосферу были введены фотосинтезирующие организмы?

42.6. Какие сведения Вы могли бы почерпнуть в результате высадки на Луне? На Марсе? На Венере?

42.7. Как Вы думаете, какими свойствами могли бы обладать гены с других планет?

42.8. Следует ли считать белок генетическим материалом? Дайте обоснованный ответ.

42.9. Что Вы думаете теперь о предположении (высказанном на стр. 18), согласно которому генетический материал возникает только в результате репликации предсуществующего генетического материала?

42.10. Дайте определение гену и генетике.

ЛИТЕРАТУРА

- P. H. Abelson. Extra-terrestrial life.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 575.
H. F. Blum. On the origin and evolution of living machines.— Amer. Sci., 1961, 49, 474.
M. Calvin. The origin of life on earth and elsewhere.— Ann. Int. Med., 1961, 54, 954.
F. Clark and R. L. M. Synge (Eds.). The origin of life on the earth. N. Y., 1959.
R. F. Eakin. An approach to the evolution of metabolism.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1963, 49, 360.
S. W. Fox. How did the life begin.— Science, 1960, 132, 200.

- S. W. Fox*. Experiments in molecular evolution and criteria of extraterrestrial Life.—*Bio-Science*, 1964, 14, 13.
- S. W. Fox* (Ed.). The origin of prebiological systems. N. Y. 1964.
- D. E. Green* and *O. Hechter*. Assembly of membrane subunits. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1965, 53, 318.
- A. R. Hochstim*. Hypersonic chemosynthesis and possible formation of organic compounds from impact of meteorites on water.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, 50, 200.
- N. H. Horowitz*. On the evolution of biochemical synthesis.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1945, 31, 153.
- S.-S. Huahg*. Life outside the solar system.—*Scient. Amer.*, 1960, N 202, 43, 55.
- Горизонты биохимии. М., изд-во «Мир», 1964.
- J. Keosian*. The origin of life. N. Y., 1964.
- J. Lederberg*. Exobiology: approaches to life beyond the earth.—*Science*, 1960, 132, 393.
- J. Lederberg* and *D. B. Cowie*. Monodust.—*Science*, 1958, 127, 1473.
- S. L. Miller* and *H. C. Urey*. Organic compound synthesis on the primitive earth.—*Science*, 1959, 130, 245.
- А. И. Опарин*. Возникновение жизни на Земле. Изд. 3. Изд-во АН СССР, 1957.
- А. И. Опарин*. Жизнь, ее природа, происхождение и развитие. Изд-во АН СССР, 1960.
- L. S. Penrose*. Self-reproducing machines.—*Scient. Amer.*, 1959, N 200, 105.
- C. Ponnamperuma*, *R. M. Lemmon*, *R. Mariner*, *M. Calvin*. Formation of adenine by electron irradiation of methane, ammonia and water.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1963, 49, 737.
- C. Sagan*. The planet Venus.—*Science*, 1961, 133, 849.
- C. Sagan*. On the origin and planetary distribution of life.—*Rad. Res.*, 1961, 15, 174.
- W. M. Sinton*. Further evidence of vegetation on Mars.—*Science*, 1959, 130, 1234.
- S. Tax*. The evolution of life v. I. Evolution after Darwin. Chicago, 1960.
- G. Wolstenholme*. (Ed.). Man. and his future. Boston, 1963.

См. Приложение VII.

ДОПОЛНЕНИЕ
И ПРИЛОЖЕНИЯ

ДОПОЛНЕНИЕ

ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ СВЕДЕНИЯ ПО БИОМЕТРИИ

I ВВЕДЕНИЕ: ЧАСТОТЫ И ПАРАМЕТРЫ

В процессе исследования часто возникает потребность сделать из имеющихся экспериментальных данных какие-либо генетические выводы. Если эти данные подвержены случайным изменениям, то для получения возможно более точного результата необходимо использовать идеи и технику биометрии. Поэтому мы рассмотрим здесь некоторые из основных принципов и методов, которые, по-видимому, могут быть полезны в генетических исследованиях.

Мы будем называть *выборкой* результаты конечного числа измерений, в некоторой идеальной совокупности, состоящей из бесконечного числа измерений. В то время как измерения, относящиеся к некоторой конечной выборке, можно охарактеризовать частотой, результаты идеальной, бесконечно большой совокупности измерений описываются *параметрами*. Различие между *частотой* и *параметром* можно проиллюстрировать с помощью монетки. Пусть наша идеальная совокупность состоит из результатов бесконечного числа подбрасываний монетки. Естественно ожидать, что в этой идеальной совокупности в 50% случаев выпадает *герб*, а в 50% случаев *решка*. Такую совокупность можно охарактеризовать с помощью параметра, или вероятности выпадения герба. Вероятность этого события записывается так: $p = 0,5$. Если сделать выборку из этой бесконечной совокупности, т. е. фактически подбросить монетку конечное число раз, то мы получим *частоту* выпадения герба по отношению к общему числу подбрасываний.

Иногда желательно по данному параметру предсказать интервал частот, ожидаемых для некоторой выборки (рис. Д—1, А). В других

случаях, наоборот, нужно уметь по заданной частоте определить интервал параметров, которые при выборке могли привести к наблюдаемой частоте (рис. Д—1, Б). Иногда желательно определить вероятности (т. е. параметры) того, что в выборках, сделанных из некоторой идеальной совокупности, будут встречаться различные альтернативы (рис. Д—1, В). Может также возникнуть потребность сравнить частоты, ожидаемые (o) для некоторой выборки и наблюдаемые в действительности (n) (рис. Д—1, Г). И, наконец, иногда нужно, используя известный параметр, сравнивать (рис. Д—1, Д) две группы статистических совокупностей (n_1 и n_2). В этой главе будут описаны методы, позволяющие ответить на все эти, а также некоторые другие вопросы.

Герб или решка, черное или белое, гладкий или шероховатый, длинный или короткий — все такие альтернативы описываются *дискретны-*

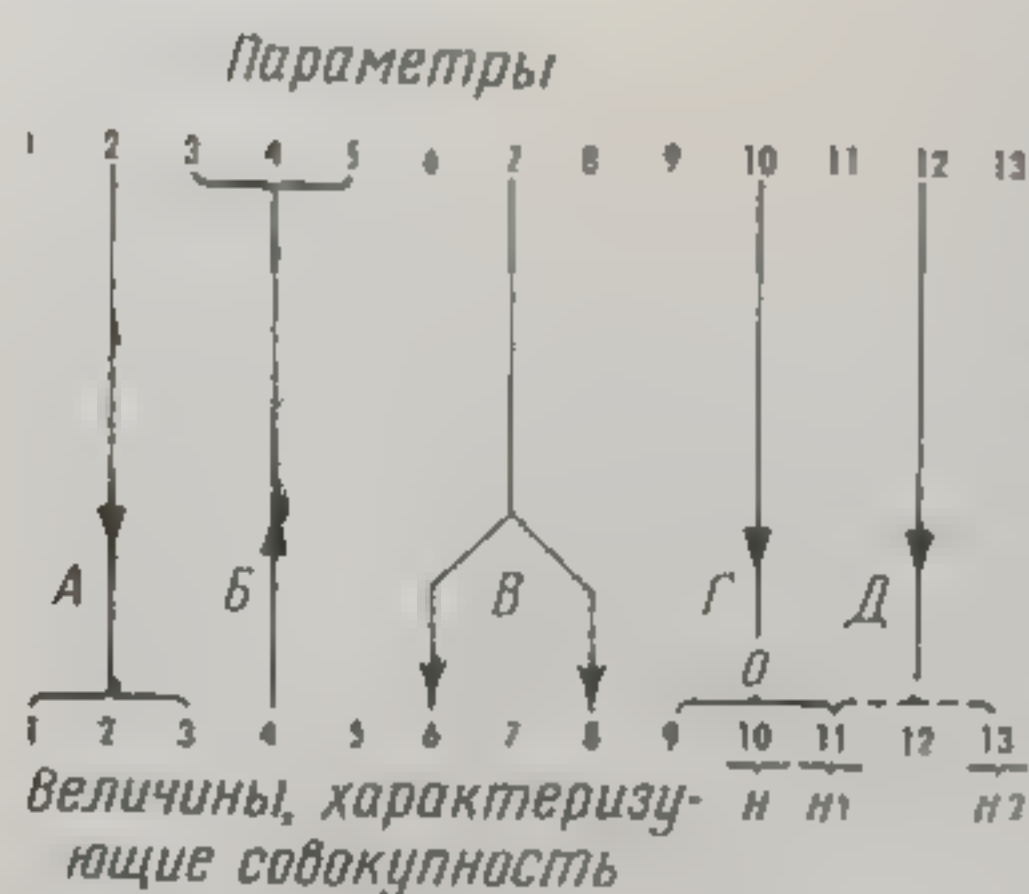


РИС. Д-1.

Биометрические процедуры, которые будут обсуждаться в разделе «Дискретные переменные» (пояснения см. в тексте).

n — наблюдаемое; o — ожидаемое. Стрелки — направление предсказания

ми переменными. Эти переменные можно просто занумеровать, поскольку во всех этих случаях возможные результаты распадаются на отдельные, легко различимые и разделимые классы. С другой стороны, такие признаки, как вес, высота, умственное развитие, описываются количественными, непрерывными, т. е. *недискретными переменными*. Эти два случая различаются по числу альтернатив, возможных в каждом случае. В случае непрерывных переменных существует бесконечное множество, а в случае дискретных переменных — лишь конечное число альтернатив. Различие исчезает, однако, если результаты упорядочены с помощью какой-либо шкалы. Например, число различных весов, промежуточных между весом толстого и худого человека, бесконечно. Тем не менее веса отсчитываются обычно по шкале, число возможных показаний которой ограничено. Другими словами, бесконечное множество возможных результатов всегда можно подсчитать или измерить конечным числом способов. Пока мы интересуемся только выборкой, единственное отличие между дискретными и непрерывными результатами состоит в том, что в последнем случае число отсчетов, описывающих возможные результаты, гораздо больше. Для регистрации выборки, описывающей любую из этих групп результатов, необходимо использовать какое-либо измерительное устройство, будь то глаз, ухо и т. п. (очень часто в сочетании с линейкой, фотоэлементом и т. д.). Сначала мы изучим связь между частотами и параметрами для дискретных результатов (небольшое число классов), а затем для непрерывных результатов (большое число классов).

Необходимо подчеркнуть, что точность вывода, полученного с помощью биометрических процедур, зависит от четырех важнейших факторов:

- 1) воображения и гибкости исследователя;
- 2) подходящих методов получения выборки;
- 3) аккуратной регистрации выборки;
- 4) правильного выбора и использования биометрических процедур.

Нелепо думать, что хороший биометрический метод может улучшить плохие данные. Биометрический анализ становится тем более эффективным, чем точнее соблюдаются при проведении эксперимента три первых условия.

II. ДИСКРЕТНЫЕ ПЕРЕМЕННЫЕ

А. Определение ожидаемого разброса частот по заданному параметру, зависящему от одной переменной (рис. Д—1, А)

Очень часто гипотеза формулируется в терминах вероятности возникновения данного события. Кроме того, часто желательно знать, какие результаты получатся при проверке этой гипотезы. Так, например, здравый смысл подсказывает, что «беспристрастная» монетка, подброшенная беспристрастным образом, с равной вероятностью может упасть вверх гербом или решкой. Будем считать выпадение герба *успехом*. Мы можем тогда сформулировать *гипотезу*, что параметр p , *вероятность успеха*, равен 50% или 0,5 от общего числа случаев, когда монетка падает плашмя. Заметьте, что в данном случае возможны только две альтернативы — успех или неудача. Поскольку в 50% случаев следует ожидать неудачи, то *вероятность неудачи* равна $1 - p$. Для описания всех возможных результатов достаточно одной переменной — вероятности успеха. (Если бы мы бросали не монетку, а абсолютно симметричную игральную кость, то в этом случае были бы возможны 6 различных и равновероятных результатов и соответственно потребовалось бы 5 переменных.

Но если считать успехом только выпадение единицы, то в этом случае снова будет достаточно одной переменной, и можно сформулировать гипотезу, что $p = 1/6$.) Какие частоты следует ожидать, если мы будем реально подбрасывать симметричную монетку? Очевидно, результат будет зависеть от того, сколько «испытаний», т. е. подбрасываний, было проведено — одно, два или много.

Ожидаемый разбор значений f

Обозначим число успехов через X , общее число испытаний (величину выборки) через N и частоту успеха через f .

Таким образом, в данном случае частота f равна $X/N = f$. Допустим, мы собрали много относительно больших выборок. Какие при этом будут получены значения f ? Можно показать, что возможные значения f определяются величиной $\sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$, называемой *квадратичным отклонением* p , или s_p . Если величина $N(p)(1-p)$ больше или равна 25, то 95% полученных значений f будут лежать между $p - 1,96s_p$ и $p + 1,96s_p$.

Если бы кто-либо заявил, что значения f могут находиться только в этом 95% *доверительном интервале*, то он был бы прав в 95% случаев и неправ в 5% случаев. В примере с монеткой ($p = 0,5$), при $N = 100$, s_p примерно равно 0,05 и следует ожидать, что в 95% случаев f будет лежать в интервале 0,4—0,6. Если сделать много выборок с $N = 100$, то можно утверждать, что 95% всех f попадут в интервал 0,4—0,6. Для одной выборки с $N = 100$ утверждение, что f будет лежать в интервале 0,4—0,6, имело бы 95 шансов из 100 быть верным и 5 шансов — неверным.

Но почему мы должны заранее смириться с тем, что в 5% случаев (или вообще в скольких-нибудь процентах случаев) мы ошибаемся? Для того чтобы быть правыми на все 100%, нам пришлось бы допустить, что в 5% случаев f может лежать вне 95% доверительного интервала. В рассмотренном выше примере это означало бы, что в 5% случаев f может лежать всюду между 0 (ни одного успеха) и 0,4 и между 0,6 и 1,0 (только успехи).

Чтобы быть правым на 100% и иметь 100%-ную уверенность, пришлось бы предсказать, что f попадет в интервал 0—1. Однако, потребовав 100%

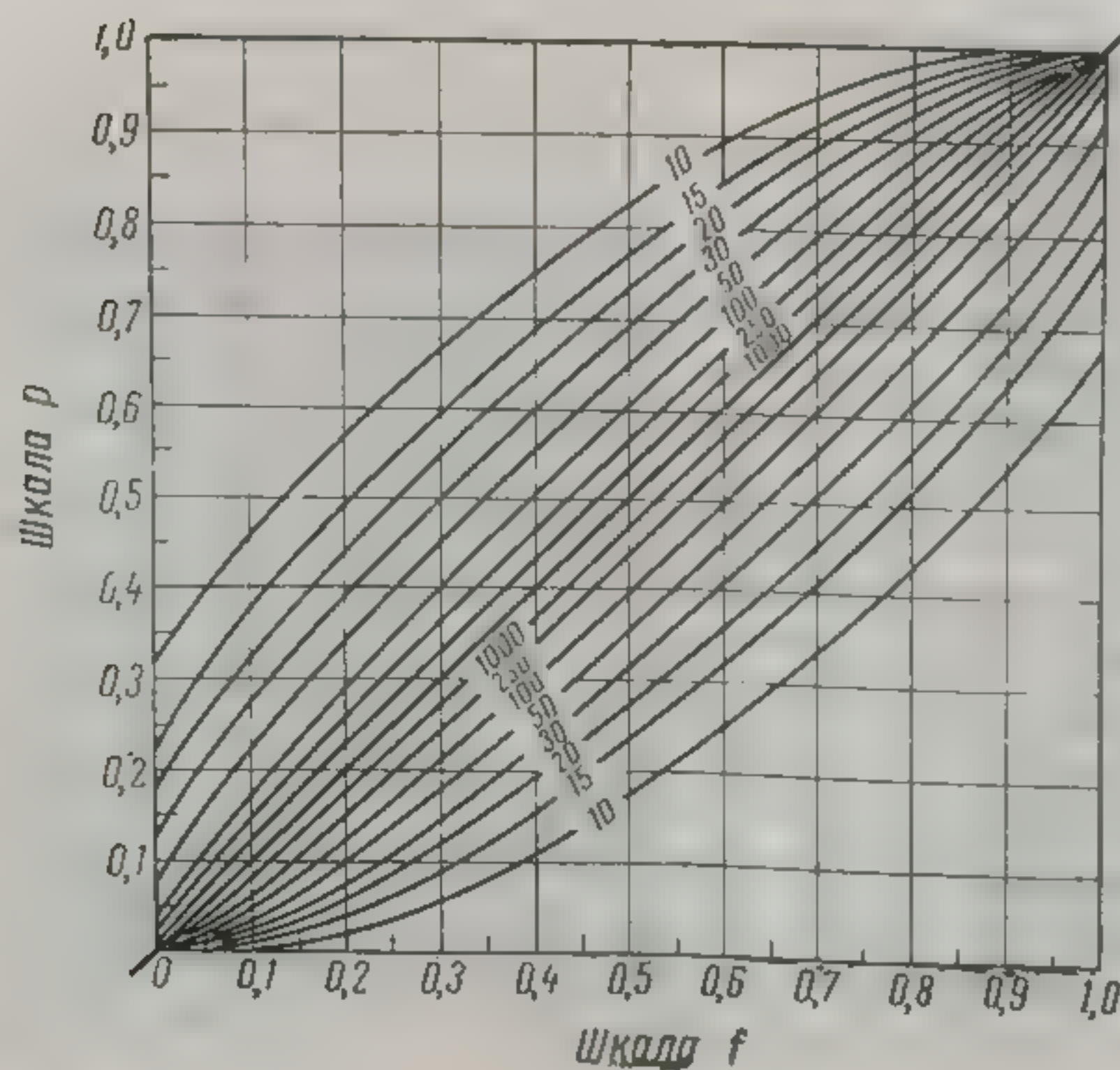


РИС. Д-2.

95%-ные доверительные интервалы

(1) для f на основе параметра p , зависящего от одной переменной. Чтобы определить доверительный интервал, найдите p на вертикальной оси. Затем двигайтесь вправо до пересечения с двумя кривыми, указывающими размер выборки. Проекция точек пересечения на горизонтальную ось дадут доверительные пределы для f ; (2) для p на основе частоты f , зависящей от одной переменной. Чтобы определить доверительный интервал, найдите f на горизонтальной оси. Затем двигайтесь вверх до пересечения с двумя кривыми, указывающими на размер выборки. Проекция точек пересечения на вертикальную ось дадут доверительные пределы для p .

правильности результатов, мы вообще лишились бы возможности отличить на практике различные p , поскольку в этом случае все другие значения p также дадут для f ожидаемый интервал 0—1. Если же мы согласимся ошибаться в 5% случаев, то интервал ожидаемых f (при $p = 0,5$, $N = 100$) можно уменьшить с (0—1) до (0,4—0,6). Для $p = 0,3$ и $N = 100$ в 95% случаев f будет примерно между 0,2 и 0,4. Таким образом, допущение 5% вероятности ошибки позволяет получать различные статистические предсказания для разных значений p . В генетике и биологии 95% доверительный интервал, как правило, считается приемлемым как для частот, так и для параметров.

По формуле, приведенной на стр. 532, легко вычислить значения s_p для всевозможных комбинаций p и N . Прделав соответствующие вычисления, можно определить 95%-ный интервал для f . Для удобства 95%-ные интервалы f для различных p и N приведены на рис. Д—2. Чтобы определить f для значений N , не показанных на рисунке, следует провести интерполяцию между соседними кривыми. Заметьте, что если бы N было бесконечно велико, f равнялось бы p а также что для любого данного p интервал f тем шире, чем меньше N .

Б. Определение ожидаемого разброса параметров по заданной частоте, зависящей от одной переменной (рис. Д—1, Б)

Если бы мы не имели никакого представления о том, какова вероятность успешного подбрасывания монетки, то мы могли бы определить возможные значения p из полученной на опыте выборки. Зная частоту f , можно оценить неизвестный параметр p . Допустим, что из 100 подбрасываний монетки 30 оказались успешными. Величина $f = 0,3$ представляет собой единичную частоту. *Наилучшая единичная оценка p есть f .* Наилучшая оценка, которую можно сделать по одному данному f , есть $p = 0,30$. Однако не следует удивляться, если p в действительности равно 0,31, 0,29, или что-нибудь около этого. Поэтому весьма важно было бы знать вероятный разброс значений p при $f = 0,3$ и $N = 100$. Этот разброс можно определить, вычислив величину $\sqrt{\frac{f(1-f)}{N}}$, которая называется

квадратичным отклонением f или s_f . Значения p , лежащие между $f - 1,96s_f$ и $f + 1,96s_f$, образуют 95%-ный доверительный интервал p , поскольку в 95% случаев следует ожидать, что данная выборка имеет p в этом интервале. Утверждение, что p не может находиться вне этого промежутка, будет ошибочным только в 5 случаях из 100. В нашем примере s_f приблизительно равно 0,05, и 95%-ный доверительный интервал p заключен примерно между 0,20 и 0,40. Следовательно, утверждение, что p должно лежать между 0,20 и 0,40, будет неверно лишь в 5% случаев. 95%-ный, доверительный интервал p для различных f можно определить с помощью графика (рис. Д—2), читая его сначала снизу вверх, а потом справа налево.

Задачи

Д.1. Вы подозреваете, что отношение полов для плодовой мухи дрозофилы равно 0,5 ♂♂ и 0,5 ♀♀. Будем считать успехом ♂. Какой разброс успехов можно ожидать с 95%-ной уверенностью при непредвзятом обследовании 100 мух? 250 мух? 1000 мух?

Как меняется доверительный предел при увеличении размера выборки? Что это значит?

Д.2. Вы намереваетесь сделать выборку с $N = 100$. Каков будет 95%-ный интервал f при следующих гипотезах: $p = 0,5$; $p = 0,3$; $p = 0,1$? Как меняется интервал f в зависимости от значения p ?

Д.3. Вы полагаете, что определенный тригибрид образует 8 различных типов гамет с одинаковой частотой. Вас интересует только один из них. Укажите вероятный разброс числа интересующих Вас гамет для выборки, содержащей 50 гамет.

Д.4. При некоторых условиях белоглазые самцы дрозофилы не очень охотно спариваются с красноглазыми самками. Пусть вероятность спаривания равна 10%. Сколько примерно раз нужно обеспечить возможности для спаривания, чтобы утверждать с достаточной уверенностью, что произойдет 5 спариваний?

Д.5. Среди 100 мух исследователь обнаружил 25 мух с коричневыми глазами. Определите с 95%-ной уверенностью истинную вероятность обнаружения мух с коричневыми глазами.

Д.6. Пользуясь рис. Д—2, определите 95%-ные доверительные пределы p при $f = 0,60$ и $N = 100, 250$ и 1000 .

Д.7. После мейоза у нейроспоры с генотипом $AaBb$ Вы получаете 100 асков. Допустим, что происходит независимое расщепление. Сколько вы ожидаете получить аскоспор со следующей генетической конструкцией: $AB? Ab + aB?$

Д.8. Пыльца, помещенная в раствор йода, окрашивается. При этом один из аллелей вызывает голубую окраску, а другой — красную. Допустим, что получена и окрашена пыльца от гибрида.

а. Выборка 1 содержит 100 пыльцевых зерен — 30 голубых и 70 красных. Какой вывод можно сделать отсюда относительно ожидаемого соотношения фенотипов 1 : 1?

б. Выборка 2 содержит 150 пыльцевых зерен — 81 голубое и 69 красных. Каково ваше заключение относительно этой выборки и соотношения 1 : 1?

в. Объедините данные выборки 1 и выборки 2 и проверьте снова соотношение 1 : 1. Каков Ваш вывод? Допустима ли такая процедура? Желательна ли она? Объясните.

Д.9. Вы хотите проверить, симметрична ли данная монетка, подбросив ее 100 раз. Как Вы можете определить, симметрична она или нет?

Д.10. В популяции, состоящей из 1000 цыплят, только 250 гомозиготны по паре генов (WW), ответственной за белый цвет оперения. Вычислите частоту W в фонде генов в предположении, что осуществляется генетическое равновесие. Дайте (а) Вашу лучшую единичную оценку; (б) оценку с 95%-ной уверенностью.

В. Определение ожидаемых относительных вероятностей по заданным параметрам, зависящим от одной переменной (рис. Д—1, В)

Как мы знаем, для симметричной монетки $p = 0,5$. Чтобы сделать такой вывод, совсем не обязательно фактически бросать монетку. Не обращаясь к опыту, можно высказать гипотезу, что вероятность падения симметричного октаэдра на определенную сторону $p = 1/8$. Точно так же вероятность того, что симметричная игральная кость упадет данной стороной вверх, равна $1/6$. Во всех этих случаях нетрудно сообразить, чему равна вероятность успеха. Однако в других случаях вероятность успеха заранее не очевидна и ее нужно определить.

1. Правила вычисления вероятности

а) **Закон сложения.** Иногда успех может осуществляться двумя или более различными, взаимоисключающими способами. Чему равна в таких случаях полная вероятность успеха?

Если при однократном бросании игральной кости вероятность «единицы» равна $\frac{1}{6}$, а вероятность «двойки» тоже равна $\frac{1}{6}$, то вероятность либо «единицы», либо «двойки» равна $\frac{1}{6} + \frac{1}{6} = \frac{1}{3}$. Вообще, вероятность осуществления любого одного из нескольких взаимоисключающих успехов равна сумме индивидуальных вероятностей. Если вероятность успеха равна p , а вероятность неудачи — q , то вероятность либо успеха, либо неудачи равна $p + q$. Но если точно известно, что данное событие должно быть либо успехом, либо неудачей, то $p + q = 1$, $p = 1 - q$ и $q = 1 - p$.

б) *Закон умножения.* Иногда общий успех зависит от одновременного или последовательного осуществления двух или более успехов, а осуществление одного успеха (или неудачи) никак не влияет на осуществление (или неудачу) других.

Если вероятность выпадения «единицы» при бросании кости равна $\frac{1}{6}$ и вероятность выпадения «единицы» при втором броске также равна $\frac{1}{6}$, то вероятность выпадения «единицы» два раза подряд равна $\frac{1}{6} \times \frac{1}{6} = \frac{1}{36}$. Вообще, вероятность осуществления нескольких независимых успехов равна произведению их индивидуальных вероятностей.

2. Биномиальное распределение

По заданному параметру, зависящему только от одной переменной, можно определить точные вероятности получения определенных комбинаций успехов и неудач, разлагая бином $(q + p)^N$. Будем считать успехом выпадение кости вверх «единицей». Если кость бросают 5 раз, то вероятности выпадения единицы 0 раз, 1 раз, 2 раза, 3 раза и т. д. определяются последовательными членами в разложении бинома:

$$\left(\frac{5}{6} + \frac{1}{6}\right)^5.$$

В этом выражении $\frac{5}{6}$ представляет собой вероятность того, что при однократном испытании не выпадет единиц, $\frac{1}{6}$ — вероятность выпадения единицы, а показатель степени 5 равен числу испытаний. Разложение этого бинома приведено ниже, в табл. 1. Заметьте, что возможен любой результат, причем каждый из них имеет свою собственную точную вероятность осуществления.

Таблица 1

$$\begin{aligned} \left(\frac{5}{6}\right)^5 + 5\left(\frac{5}{6}\right)^4\left(\frac{1}{6}\right) + 10\left(\frac{5}{6}\right)^3\left(\frac{1}{6}\right)^2 + 10\left(\frac{5}{6}\right)^2\left(\frac{1}{6}\right)^3 + \\ + 5\left(\frac{5}{6}\right)\left(\frac{1}{6}\right)^4 + \left(\frac{1}{6}\right)^5 \end{aligned}$$

| | | | | | | | |
|---------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| точное значение p | = | 0,4019 | 0,4019 | 0,1607 | 0,0321 | 0,0032 | 0,0001 |
| число «единиц» | = | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

Задачи

Д.11. Вы бросаете кость 3 раза. Какова вероятность получить: а) подряд три «четверки»? б) «один», «два» и «три» в указанной последовательности?

Д.12. Вы бросаете одновременно две игральные кости. Какова вероятность получить в сумме одиннадцать? Два? Семь?

Д.13. Копейка, гривенник, двугривенный, полтинник и рубль подброшены одновременно вверх. Какова вероятность того, что они упадут: а) все вверх гербом, или все вверх решкой; б) три вверх решкой и 2 — гербом?

Д.14. Какова точная вероятность того, что подброшенная несколько раз монетка (монетка считается вполне симметричной) упадет:

- вначале 2 раза решкой вверх, а затем 3 раза вверх гербом?
- 4 раза подряд решкой?

в) 5 раз подряд гербом?

Д.15. Какова точная вероятность 10 успехов, если $p = 1/3$ и $N = 15$?

Д.16. Как часто следует ожидать менее 3 успехов, если $p = 1/4$ и $N = 5$?

Д.17. Вы усыпили мух из потомства скрещивания ci^+ci и ci^+ci дрозофилы. Какова вероятность того, что среди первых трех мух, выбранных случайным образом, есть только одна $ci\ ci$? То же самое для выбранных случайным образом 5 мух?

Д.18. В результате независимого расщепления генов $Aa\ Bb\ Cc$ образуется аск. Какова вероятность того, что две аскоспоры, выбранные случайным образом, будут типа ABC ? abc ? Либо ABC , либо abc ?

Д.19. Мужчина-альбинос (aa), обладающий группой крови MN , вступает в брак с женщиной, гетерозиготной по гену альбинизма (Aa) и обладающей группой крови MN . Они собираются иметь 4 детей.

Допуская независимое расщепление, ответьте на вопрос, какова вероятность того, что среди их детей будут:

а) все неальбиносы?

б) 2 неальбиноса с группой крови MN ?

в) 3 ребенка с группой крови MN ?

Г. Сравнение наблюдаемых частот с ожидаемыми (рис. Д—1, Г)

1. Биномиальный критерий для параметра, зависящего от одной переменной.

Для некоторого скрещивания генетическая теория предсказывает в F_1 отношение 1 : 1 ($p = 0,50$). Согласно биномиальному распределению, следует ожидать, что среди 6 особей будут наблюдаться 3 особи одного типа и 3 другого в 5 случаях из 16. Такой результат будет получаться наиболее часто. Все остальные сочетания будут осуществляться с меньшей частотой. Допустим, однако, что в реальном эксперименте все шесть особей оказались одного типа.

Следует ли считать это наблюдение статистически незначимым и обусловленным только случайным изменением? Или это различие статистически значимо и указывает на то, что ожидаемые результаты не всегда согласуются с результатами наблюдений? Чтобы ответить на этот вопрос, вычислим, исходя из нашей гипотезы, вероятность получения 6 особей одного типа. По предположению, вероятность того, что отдельная особь будет принадлежать к первому типу, равна $1/2$, и вероятность того, что она будет принадлежать ко второму типу, также равна $1/2$.

Вероятность того, что все шесть особей будут первого типа, равна $(1/2)^6$; вероятность того, что все шесть особей будут второго типа, также равна $(1/2)^6$.

Таким образом, вероятность того, что либо все шесть особей будут первого типа, либо все шесть — второго, равна $(1/2)^6 + (1/2)^6 = 0,03$. Как видно, если исходная гипотеза верна, то вероятность такого результата очень мала. Поэтому отсюда следует один из двух выводов. Либо гипотеза верна, но осуществилась крайне маловероятная ситуация, либо гипотеза не согласуется с результатами наблюдений.

Поскольку событие, вероятность которого 0,03, должно было бы осуществляться только в 3 случаях из 100, мы выберем вторую альтернативу. Следовательно, мы делаем вывод, что гипотеза, по-видимому, неверна.

Вообще, чтобы проверить, согласуются ли наблюдаемые результаты с данным значением параметра, проверяют так называемую *нулевую гипотезу*, т. е. правдоподобие того, что полученная выборка действительно имеет предполагаемое значение параметра. Это делают следующим

образом. Исходя из заданного значения параметра, вычисляют полную вероятность получения частоты, которая является крайним случаем или вообще лежит за пределами наблюдаемых частот. Если эта вероятность мала (по общепринятому соглашению 0,05 или меньше), то можно сделать вывод, что наблюдаемые результаты не согласуются с ожидаемыми. Мы отвергаем исходную гипотезу с 95% уверенностью и с уровнем значимости в 5% (т. е. существует 5% вероятность отвергнуть гипотезу, которая в действительности верна). Если вероятность превышает 0,05 (5%), то можно считать, что наблюдения не противоречат исходной гипотезе. Следовательно, эта гипотеза приемлема. Если вероятность значительно меньше 0,05, порядка 0,01 или еще меньше, то принято считать расхождение очень большим.

Рассмотрим еще один пример. В группе, состоящей из 8 особей, было обнаружено 6 особей одного типа и 2 особи другого типа. Допустим, что теоретическое отношение равно 1 : 1. Согласно нулевой гипотезе, вероятность получить в группе из 8 особей только 2 особи одного типа (крайний наблюдавшийся случай) или еще меньше, дается суммой следующих членов, полученных при разложении

$$\begin{aligned} & \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2}\right)^8. \\ \text{Вероятность 0 особей первого типа} &= \left(\frac{1}{2}\right)^8 \\ & \gg 1 \gg \gg = 8 \times \left(\frac{1}{2}\right)^8 \\ & \gg 2 \gg \gg = 28 \times \left(\frac{1}{2}\right)^8 \\ & \gg 2 \gg \text{второго типа} = 28 \times \left(\frac{1}{2}\right)^8 \\ & \gg 1 \gg \gg = 8 \times \left(\frac{1}{2}\right)^8 \\ & \gg 0 \gg \gg = \left(\frac{1}{2}\right)^8 \end{aligned}$$

Складывая отдельные вероятности, находим, что полная вероятность обнаружить только две (или еще меньше) особи одного типа $= 74/256 = 0,29$. Поскольку полная вероятность больше 0,05, полученный результат согласуется с исходной гипотезой. Следовательно, гипотеза приемлема.

2. Критерий доверительного интервала для параметра, зависящего от одной переменной.

В только что рассмотренных примерах биномиальный критерий применялся для случаев, когда N меньше 10. Биномиальный критерий можно использовать также и при N , большем 10. Однако при $N \gg 10$ это довольно затруднительно. Проще пользоваться ожидаемым интервалом f . Этот интервал можно определить, исходя из предполагаемого значения параметра, зависящего от одной переменной, с помощью графика, изображенного на рис. Д—2.

Пусть $f = 0,3$ и $N = 100$. Какой вывод можно сделать относительно нулевой гипотезы $p = 0,5$? Если бы $p = 0,5$ и $N = 100$, то 95% f лежало бы между 0,4 и 0,6. Поскольку $f = 0,3$, мы можем отвергнуть $p = 0,5$. Если бы $f = 0,43$ и $N = 100$, то можно было бы принять $p = 0,5$.

Нужно отметить, что выводы относительно значения параметра, сделанные с помощью графика Д—2, имеют 5% уровень значимости. Мы можем лишь отвергать или принимать гипотетические параметры, поскольку они представляют идеализированные заключения относительно ожидаемой выборки. Выборка же отражает реально наблюдаемые факты, и ее нельзя отвергнуть.

3. Критерий χ -квадрат для параметра, зависящего от одной переменной.

Полезно описать еще один метод проверки параметра, зависящего от одной переменной, который, так же как и критерий ожидаемого интервала, можно применять при достаточно больших N . Пусть ожидается отношение 1 : 1, и, следовательно, в идеальном случае выборка, состоящая из 100 случаев, должна содержать 50 случаев одного типа и 50 случаев другого. Допустим, что реально наблюдается 55 случаев одного типа

и 45 другого. Чтобы решить, согласуются ли наблюдаемые результаты с ожидаемыми, нужно, исходя из нулевой гипотезы, определить вероятность получения такого результата (или результата, еще более отличающегося от ожидаемого) в выборке с $N = 100$, сделанной из идеальной совокупности. Хотя эту вероятность в принципе можно найти, суммируя соответствующие члены в разложении $(1/2 + 1/2)^{100}$, практически для этого потребовалось бы слишком много времени (если, конечно, не пользоваться счетной машиной).

Из теории вероятности известно, однако, что желаемую вероятность можно приближенно выразить через величину, называемую χ -квадрат (χ^2) с помощью сравнительно простой выкладки:

$$\chi^2_{(1)} = \sum \frac{[(\text{наблюдаемое} - \text{ожидаемое}) - 1/2]^2}{\text{ожидаемое}}$$

Член $1/2$ называется поправкой Йетса. Если N и ожидаемые величины велики, то его можно опустить, но безопаснее все же учитывать его при практических вычислениях. Чтобы воспользоваться выписанной формулой, нужно для каждого класса (в нашем случае есть только два класса — успех и неудача, и, следовательно, можно считать, что χ^2 имеет одну степень свободы — $\chi^2_{(1)}$) найти абсолютную величину разности между наблюдаемыми и ожидаемыми числами, вычесть из остатка $1/2$ и возвести результат в квадрат. После этого полученная величина делится на ожидаемое число. Эту процедуру нужно проделать для каждого класса и просуммировать члены, относящиеся ко всем возможным классам. Итак, в нашем случае:

$$\begin{aligned} \chi^2_{(1)} &= \frac{[(45-50)-1/2]^2}{50} + \frac{[(55-50)-1/2]^2}{50} = \\ &= \frac{(4\frac{1}{2})^2}{50} + \frac{(4\frac{1}{2})^2}{50} = \frac{40,5}{50} = 0,8. \end{aligned}$$

Искомая вероятность определяется по графику χ^2 (рис. Д—3) для одной степени свободы. (Число степеней свободы для такого критерия на единицу меньше числа классов, т. е. равно числу переменных.) Таким образом, по графику на рис. Д—3 находим, что вероятность лежит между 0,35 и 0,40. Расхождение между наблюдаемым результатом и результатом, ожидаемым из нулевой гипотезы, незначимо. Следовательно, эту гипотезу можно принять.

Метод χ -квадрат является приближенным и применим только для сравнительно больших выборок. Для его использования необходимо, чтобы ни один класс не имел ожидаемого значения меньше 2, и чтобы большинство ожидаемых значений по крайней мере равнялось 5.

4. Критерий χ -квадрат для параметра, зависящего от двух или более переменных.

Критерий χ^2 применим также для параметров, описывающих более чем два возможных результата, и, следовательно, зависящих от двух или более переменных.

Например, критерий χ -квадрат можно использовать для того, чтобы определить, согласуется ли некоторая выборка с предполагаемым отношением 9 : 3 : 3 : 1. В идеальном случае при проверке отношения 9 : 3 : 3 : 1 следовало бы ожидать в группе из 80 особей, соответственно, 45, 15, 15 и 5 представителей каждого класса.

В данном случае существует четыре класса и соответственно 3 переменных или степени свободы.

Если бы в результате реального эксперимента были получены числа 40, 20, 12 и 8 соответственно, то мы бы вычислили:

$$\chi^2_{(3)} = \frac{(40-45)^2}{45} + \frac{(20-15)^2}{15} + \frac{(12-15)^2}{15} + \frac{(8-5)^2}{5} = 4,6.$$

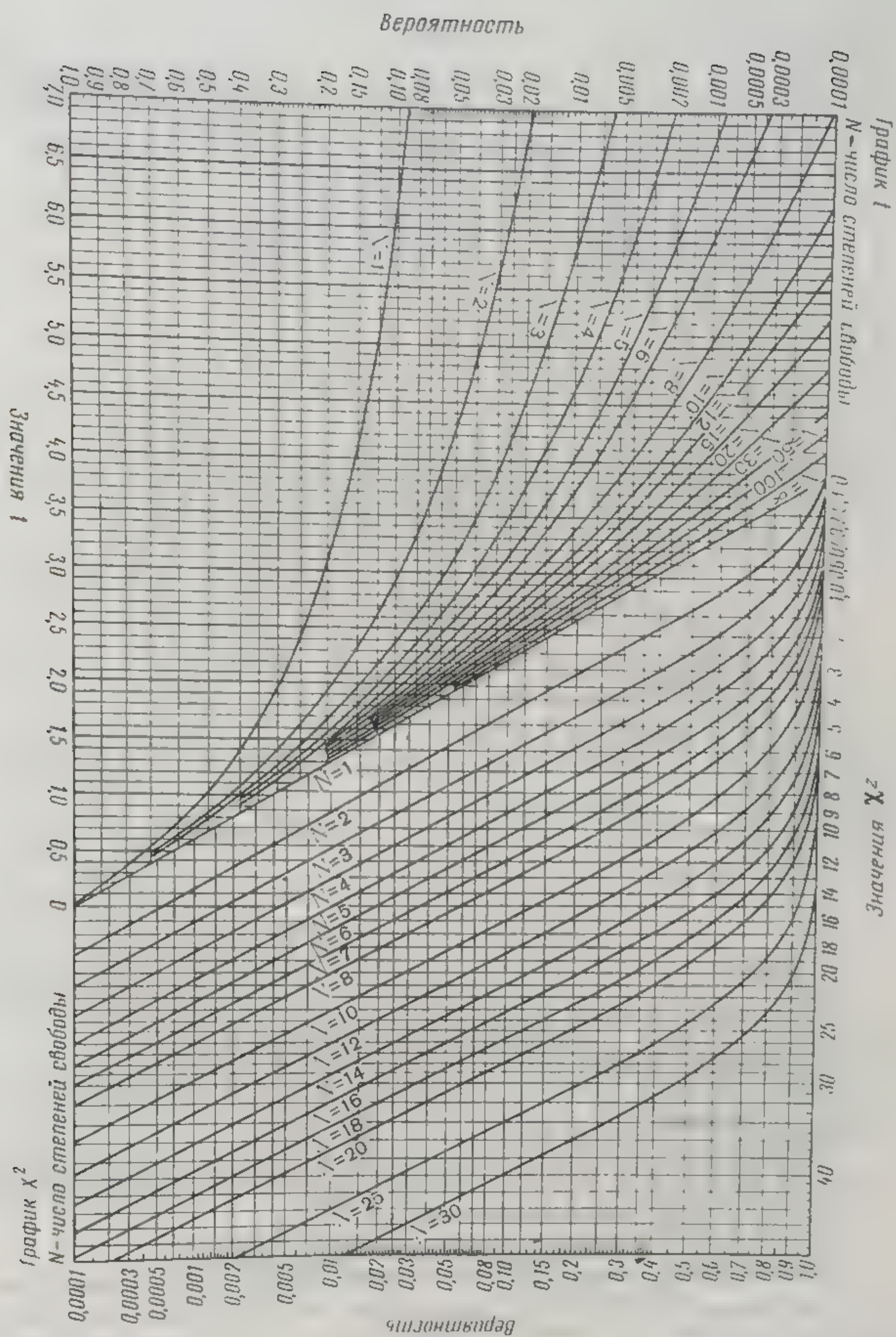


РИС. Д-3.

Распределения χ^2 и t .

Чтобы прочесть диаграмму для χ^2 , равного 17, для случая 7 степеней свободы, нужно двигаться вверх по линии, соответствующей величине χ^2 , равной 17, до пересечения с кривой, соответствующей $N=7$. Спроецировав эту точку на шкалу вероятностей, получаем, что вероятность равна 0,017. Если диаграмму перевернуть, то точно таким же образом можно определить вероятности для распределения t . Приведенная вероятность есть вероятность наибольшего по величине отклонения.

(Член $1/2$, поправка Йетса, не учитывается в случае более чем одной степени свободы.) Поскольку соответствующая вероятность лежит между 0,20 и 0,25, расхождение незначимо и, следовательно, нулевая гипотеза приемлема.

Интересно отметить, что вероятность получить для χ^2 величину, большую или равную 0,004 для одной степени свободы, 0,1 для двух степеней свободы и т. д., равна 0,95. Следовательно, вероятность получить значения χ^2 меньше указанного выше должна равняться 0,05. Получение при реальной проверке столь малых величин указывает на то, что согласие между ожидаемыми и наблюдаемыми результатами, по-видимому, лучше, чем предполагалось. В таких случаях законно поставить вопрос, действительно ли полученные данные представляют аутентичные случайные выборки.

Задачи

Д.20. Мужчина с шерстистыми волосами вступает в брак с женщиной с нормальными волосами; у них родилось 8 детей: 7 с шерстистыми и 1 с нормальными волосами. Проверьте гипотезу о том, что шерстистость волос обусловлена редким, полностью доминантным геном.

Д.21. Основываясь на данных Д.20, проверьте гипотезу, что шерстистость волос обусловлена абсолютно рецессивным мутантным геном.

Д.22. Монетку бросают 7 раз. 1 раз она падает на ребро, 5 раз вверх решкой и 1 раз гербом. «Честная» ли эта монетка?

Д.23. В результате анализирующего скрещивания получено 57 особей фенотипа A и 43 особи фенотипа A' . Одна или несколько пар генов обуславливает данный признак?

Д.24. Основываясь на данных Д.23, проверьте гипотезу о том, что один из родителей — дигибрид, и что фенотип A получается только в том случае, когда присутствуют два специфических неаллельных гена.

Д.25. В выборке, содержащей 540 событий, $X = 90$. Чему равно χ^2 , если предположить, что $p = 1/4$? Приемлема ли эта гипотеза?

Д.26. Среди 60 особей встречаются следующие фенотипы: 8A, 12B, 20C и 20D. Проверьте гипотезу о том, что

а) $ABCD$ встречаются в пропорции 1 : 3 : 3 : 9.

б) Все четыре фенотипа встречаются с равной вероятностью.

в) Идеальное отношение есть $1A : 3B : 5C : 7D$.

Д.27. Случайная выборка, сделанная из природной популяции, содержит 65AA, 95Aa и 40aa особей. Проверьте следующие гипотезы (принимая во внимание изложенное в главе 15):

а) частота a в генофонде популяции равна 0,5,

б) выборка согласуется с предположением о том, что популяция находится в генетическом равновесии по этому локусу, если допустить, что наблюдаемая в выборке частота гена a равна его частоте во всей популяции.

Д. Сравнение выборок (рис. Д—1, Д)

Г. Случай одной переменной

а) Наблюдаемое различие и ожидаемое квадратичное отклонение.

Пусть в результате выборки (А) обнаружено 20 самцов и 30 самок, в то время как другая выборка (В) дала 30 самцов и 20 самок. Насколько значительно различие между частотами появления самцов в этих двух выборках ($f_A = 0,40$ и $f_B = 0,60$; $N_A = 50$, $N_B = 50$)? Мы не имеем

никакого представления о том, каковы должны быть p_A и p_B . Согласно нулевой гипотезе, эти две выборки имеют один и тот же параметр p_x . Наша наилучшая оценка p_x есть (f_x) , которое получается при усреднении результатов обеих выборок, что дает $50/100 = 0,50$. Вычислим теперь, как велико различие между наблюдаемыми f по сравнению с полным квадратичным отклонением, которого следовало бы ожидать, если бы в обеих выборках, N_A и N_B , f равнялось f_x . Необходимые вычисления можно проделать с помощью следующей формулы:

$$\frac{f_B - f_A}{\sqrt{\frac{f_x(1-f_x)}{N_A} + \frac{f_x(1-f_x)}{N_B}}} = \frac{0,20}{\frac{0,5 \times 0,5}{50} + \frac{0,5 \times 0,5}{50}} = 2,0.$$

(Вычитание в числителе нужно делать так, чтобы получить в результате положительное число, т. е. нужно взять абсолютную величину разности.) Как было показано, при N_x , большем 30, величины, равные или больше 2, могут случайно встретиться лишь в 5% случаев. Мы приходим, следовательно, к выводу, что две рассматриваемые выборки с 5%-ным уровнем значимости находятся на границе между статистически различными и статистически одинаковыми выборками.

б) Плюс минус критерий (критерий знаков).

Пусть нам нужно определить, может ли некоторая специальная обработка подопытных объектов изменить выборку. Допустим, кроме того, что нас не интересует, насколько велики индуцированные изменения по сравнению с изменениями, происходящими спонтанно. (Обработка могла вызвать лишь очень небольшие изменения. При таких условиях, чтобы получить статистически значимое различие между измерениями, потребовались бы две чрезвычайно большие выборки — одна контрольная, другая подопытная.)

Чтобы обеспечить максимально возможную чувствительность, нужно выполнить серию параллельных наблюдений над такими парами объектов, члены которых подобны друг другу настолько, насколько можно.

Представьте себе, например, что мы хотим определить, оказывает ли какое-нибудь влияние подкормка развивающегося самца дрозофилы солью на отношение полов в его потомстве. Проверка состоит в подсчете отношения полов в потомстве двух скрещиваний, в одном из которых самец получал соль, а в другом — нет. Допустим, что эксперимент выполнен вполне корректно и получены следующие результаты:

| Наблюдавшиеся парные группы | Отношение полов $\sigma\sigma/\varphi\varphi$ | | \pm критерий | |
|--------------------------------|--|------|----------------------|------|
| | контроль | опыт | контроль | опыт |
| 1 | 0,47 | 0,46 | + | — |
| 2 | 0,48 | 0,47 | + | — |
| 3 | 0,49 | 0,48 | + | — |
| 4 | 0,50 | 0,50 | Критерий не работает | |
| 5 | 0,46 | 0,44 | + | — |
| 6 | 0,51 | 0,50 | + | — |
| 7 | 0,48 | 0,47 | + | — |

Теперь мы приступим к проверке нулевой гипотезы, согласно которой подкормка солью не влияет на отношение полов F_1 . Согласно этой гипотезе, случаи, когда подопытная пара имеет большее отношение полов,

чем контрольная, и противоположные случаи должны наблюдаться с равной вероятностью. Следовательно, по нулевой гипотезе $p = 1/2$. В нашем распоряжении имеется только 6 тестов этой нулевой гипотезы, поскольку один тест дал одинаковое отношение полов как для подопытных, так и для контрольных пар. Вероятность того, что все эти 6 контрольных измерений будут успехами или все неудачами, согласно нулевой гипотезе, равна $2 (1/2)^6$ или $1/32$, т. е. около 3%. (Вероятность того, что остальные 5 тестов дадут тот же результат, что и первый, равна $(1/2)^5$, т. е. также около 3%.) В соответствии с этим нулевую гипотезу можно отвергнуть с 5%-ным уровнем значимости. Статистическая проверка указывает, что интересующие нас параметры различны для подопытных и контрольных пар.

Из приведенных данных следует, что в результате солевой подкормки отношение полов уменьшается. (Из этих данных нельзя определить, увеличивает ли солевое питание число самок или уменьшает число самцов. Отсюда можно лишь найти различие в отношении полов в зависимости от присутствия или отсутствия соли. Истинный механизм этого явления остается неизвестным.)

в) Проверка критерия χ -квадрат

с помощью таблиц сопряженности признаков

Пусть $X_A = 3$ и $N_A = 6$ для выборки А и $X_B = 5$ и $N_B = 18$ для выборки В. Являются ли эти статистические совокупности различными с 5% уровнем значимости? Чтобы ответить на этот вопрос, нужно проверить нулевую гипотезу, согласно которой обе выборки характеризуются одним и тем же параметром (p). Однако величина p совершенно неизвестна. Наиболее вероятные значения X (и, следовательно, $N - X$) можно найти (в предположении, что параметры p одинаковы для обеих выборок), построив таблицы сопряженности признаков. Определив эти величины, ожидаемые в идеальном случае, можно затем приступить к вычислению χ -квадрата, так же как и раньше.

Результаты наблюдений нужно расположить, как показано на рис. Д-4. А. Наилучшие оценки, ожидаемые при неизвестном p , приве-

Классы выборки Всего

| | А | В | |
|---------|---|----|----|
| Успехи | 3 | 5 | 8 |
| Неудачи | 3 | 13 | 16 |
| Всего | 6 | 18 | 24 |

А. Действительные данные

| | | |
|---|----|----|
| 2 | 6 | 8 |
| 4 | 12 | 16 |
| 6 | 18 | 24 |

Б. Ожидаемые данные

| | |
|----|----|
| 1 | -1 |
| -1 | 1 |

В. Разница (А-Б)

| | |
|--------|--------|
| $1/2$ | $-1/2$ |
| $-1/2$ | $1/2$ |

Г. (В) с поправкой Йетса

| | |
|-------|-------|
| $1/2$ | $1/2$ |
| 2 | 6 |
| $1/4$ | $1/4$ |
| 4 | 12 |

Д. (Г) в квадрате ожидаемое

Сумма значений в (Д) равна χ^2

РИС. Д-4.

Таблицы сопряженности признаков «2 × 2»

дены в табл. Б. Например, чтобы получить величину, ожидаемую в верхнем левом квадрате табл. А, нужно умножить сумму цифр в столбце, содержащем этот квадрат, на сумму цифр в строке, содержащей этот же квадрат (требуемые суммы приведены в конце соответствующих строк и столбцов), и поделить на $N_A + N_B$. Полученная величина равна $(6 \times 8/24)$, т. е. 2.

Поскольку мы имеем в данном случае дело с χ^2 , уместно вспомнить, что для применения этого критерия обычно требуется, чтобы не было ни одного класса с ожидаемой частотой меньше 2 и чтобы большинство ожидаемых значений были по крайней мере равны 5.

Заметим, что остальные ожидаемые величины, выписанные в табл. Б, можно получить аналогичным образом. Однако на самом деле нет нужды проделывать снова эту процедуру, поскольку все остальные величины фиксируются заданием сумм элементов по строкам и столбцам. Эти суммы (приведенные в крайних столбцах и строках) должны быть одинаковы в табл. Б и А. Поэтому для записанной таким образом (2×2) таблицы сопряженности есть только одна степень свободы (одна переменная). После того, как построены табл. А и Б, строится таблица разностей В. В этой таблице элементы, расположенные крест-накрест, одинаковы, а суммы по всем столбцам и строкам равны нулю. При учете поправки Йетса каждая величина в табл. В уменьшается по абсолютной величине на $1/2$. Исправленные таким образом разности приведены в табл. Г. Каждый из элементов табл. Г возводится затем в квадрат и делится на соответствующую ожидаемую величину, выписанную в табл. Б. Сумма полученных четырех величин $(\frac{1}{4}/2 + \frac{1}{4}/6 + \frac{1}{4}/4 + \frac{1}{4}/12)$ и есть χ -квадрат. В данном случае χ -квадрат меньше 1 (но больше 0,004) и имеет вероятность больше 10%. Таким образом, нулевая гипотеза принимается, т. е. две рассматриваемые выборки с 5% уровнем значимости статистически не различаются.

Две или более переменные

Проверка критерия χ -квадрат с помощью таблиц сопряженности признаков. Иногда данные, включенные в выборку, распадаются более чем на два класса (т. е. возможно больше двух различных результатов) и нужно сравнить больше двух таких выборок. В этом случае число переменных определяется, во-первых, числом классов минус единица, а во-вторых, числом выборок минус единица. Полное число переменных равно произведению этих двух чисел. Число степеней свободы равно полному числу переменных, которое всегда равно (числу рядов — 1), умноженному на (число строк — 1) (для таблицы сопряженности признаков).

Пусть три выборки разбиты на группы в соответствии с четырьмя возможными результатами. Полученные результаты приведены на рис. Д—5, А. Дальнейшая процедура полностью аналогична описанной выше для четырехклеточной (2×2) таблицы. Заметьте, что для таблиц большего размера поправку Йетса не нужно учитывать. В рассматриваемом случае есть 6 степеней свободы. Если проверка проводится с 5%-ным уровнем, то, как видно из рис. Д—3, для того, чтобы отвергнуть нулевую гипотезу, согласно которой все выборки и все классы могут быть представлены одними и теми же параметрами, $\chi_{(6)}^2$ должно быть больше 12,5. Кроме того, если бы χ^2 оказалось меньше 1,6, это означало бы, что при одинаковых значениях параметров, выборки, результаты которых столь мало отличаются от ожидаемых в идеальном случае, встречались бы только в 5 случаях из 100. В этом случае следует отвергнуть предположение о том, что выборки были сделаны случайным образом. Можно подо-

| | | Выборки | | | |
|-----------------------|---|---------|----|----|----|
| | | R | S | T | |
| Классы или результаты | ■ | 5 | 2 | 4 | 11 |
| | ■ | 4 | 3 | 6 | 13 |
| | ○ | 3 | 4 | 4 | 11 |
| | ■ | 8 | 5 | 2 | 15 |
| | | 20 | 14 | 16 | 50 |

А. Действительные данные

| | | | |
|------|------|------|----|
| 4,40 | 3,08 | 3,52 | 11 |
| 5,20 | 3,64 | 4,16 | 13 |
| 4,40 | 3,08 | 3,52 | 11 |
| 6,00 | 4,20 | 4,80 | 15 |
| 20 | 14 | 16 | 50 |

Б. Ожидаемые данные

| | | |
|------|------|------|
| 0,60 | 1,08 | 0,48 |
| 1,20 | 0,64 | 1,84 |
| 1,40 | 0,92 | 0,48 |
| 2,00 | 0,80 | 2,80 |

В Разница (А Б)

| | | |
|---------------|----|--------------------|
| <1 | <1 | <1 |
| <1 | <1 | 1 |
| <1 | <1 | 1 |
| $\frac{4}{6}$ | <1 | $\frac{7,84}{4,8}$ |

Г(В) в квадрате
ожидаемое

РИС. Д-5.
Таблицы сопряженности признаков «3 × 4»

нам попались данные (такие данные случайно встречаются в 1 случае из 20), столь сильно отличающиеся от ожидаемых, или

б) нулевая гипотеза не справедлива. Даже если гипотеза отвергнута с 5%-ным уровнем, мы можем пожелать провести дальнейшую проверку данных, используя таблицы сопряженности признаков меньшего размера, чтобы определить, какие выборки (или возможные результаты) согласуются (или не согласуются) друг с другом согласно нулевой гипотезе.

Отметим, что наибольший вклад в χ^2 -квадрат вносят те элементы таблицы сопряженности признаков, которые описывают наблюдаемые величины, играющие главную роль в опровержении исходной гипотезы.

Задачи

Д.28. В результате скрещивания получено потомство, состоящее из 20 особей одного типа и 40 особей другого типа. Через месяц в результате такого же скрещивания получено 15 особей первого типа и 15 второго. Значимо ли различаются эти результаты?

Д.29. Было отобрано 10 пар идентичных близнецов. Только один из членов каждой пары (всегда один и тот же) ежедневно в течение 10 дней получал определенный препарат. Все особи взвешивались до и после этого периода. Изменения в весе, округленные до ближайшего целого числа (в фунтах), приведены в следующей таблице.

Проведите статистический анализ результатов этого эксперимента.

| Пара | Контрольный | Подопытный | Пара | Контрольный | Подопытный |
|------|-------------|------------|------|-------------|------------|
| 1 | +1 | +1 | 6 | +3 | +2 |
| 2 | +2 | +1 | 7 | -2 | +1 |
| 3 | -4 | -3 | 8 | +4 | +3 |
| 4 | +1 | +2 | 9 | -1 | 0 |
| 5 | -3 | -2 | 10 | +5 | -4 |

зреть, что при сборе или обработке данных была допущена скрытая необъективность.

Однако из рис. Д—5, Г видно, что на самом деле для χ^2 не осуществляется ни первая, ни вторая возможность. Следовательно, можно принять нулевую гипотезу, согласно которой с 5% уровнем значимости исследуемые выборки статистически не различаются.

Допустим, однако, что в предыдущем примере было получено значение χ^2 , равное 14,1. В этом случае нулевую гипотезу следует отвергнуть с 5% уровнем, но можно принять с 1% уровнем значимости (т. е. вероятность того, что данные выборки имеют одинаковые параметры, больше 1%, но меньше 5%). Если допустить, что такой результат был получен в результате вполне объективного исследования, то он может быть обусловлен тем, что:

а) нулевая гипотеза верна, но

5 р
соот
чис
сит
ког
все
каж
15%
400
Сра
эти
исп
Д
тали
Пол

кам
пик
воло

Ш. Н
А. П

Пуст
боль
вае
резул
ожид
норм
распр
рени
встре
ческо
Сред

35 и.

Д.30. Среди женщин, принадлежащих к популяции А, 10 блондинок, 5 рыжеволосых и 15 женщин с другим цветом волос; в популяции Б, соответственно, 7, 7 и 6, в то время как в популяции В соответствующие числа равны 8, 4 и 8. Одинаковы ли рассматриваемые популяции по относительной частоте появления этих типов волос?

Д.31. Эксперимент проводился четыре раза. X равно 5, 7, 10 и 11, когда Y равно 8, 20, 20, 30 соответственно. Согласуются ли между собой все эти четыре результата?

Д.32. На двух пакетиках с семенами травы написано, что из семян каждого пакетика должно вырасти 40% травы типа А, 35% травы типа Б, 15% травы типа В и 10% сорняков Г. Выборка из пакетика 1 дает 400 А, 400 Б, 50 В и 150 Г. Выборка из пакетика 2 дает 390 А, 410 Б, 70 В и 13 Г. Сравните содержание каждого пакетика с содержащим, указанным на этикетке, и друг с другом. Каковы Ваши выводы?

Д.33. Фармацевтическая фирма получает сведения о результатах использования (или неиспользования) ее продукции.

Для проверки объективности испытаний контрольная и экспериментальная группы классифицируются по цвету глаз и типу крови АВО. Полученные результаты приведены в следующей таблице:

| Группы | AB | | A | |
|-------------------|---------|-------|---------|-------|
| | Голубые | Карие | Голубые | Карие |
| Контрольная . . . | 7 | 6 | 12 | 10 |
| Экспериментальная | 4 | 8 | 13 | 8 |

| Группы | B | | O | |
|-------------------|---------|-------|---------|-------|
| | Голубые | Карие | Голубые | Карие |
| Контрольная . . . | 4 | 4 | 8 | 9 |
| Экспериментальная | 5 | 2 | 8 | 12 |

Какой вывод следует отсюда относительно объективности испытаний?

Д.34. Допустим, что женщины классифицируются по двум признакам: цвету волос и темпераменту. Используя результаты, приведенные ниже, проверьте гипотезу о том, что не существует связи между цветом волос и темпераментом.

| | Блондинки | Рыжеволосые | Брюнетки |
|------------------------------|-----------|-------------|----------|
| Легко возбуждаемые | 23 | 6 | 11 |
| Спокойные | 26 | 3 | 31 |
| Нормальные | 41 | 9 | 30 |

III. НЕПРЕРЫВНЫЕ ПЕРЕМЕННЫЕ

A. Параметры и нормальная кривая

Пусть результат некоторого измерения определяется действием очень большого числа независимых переменных, причем каждая из них оказывает на измерение примерно одинаковое по величине влияние. Если собрать результаты бесконечно большого числа таких измерений, то следует ожидать, что соответствующие величины будут иметь так называемое нормальное распределение. На рис. Д—6 изображена кривая нормального распределения. Здесь по горизонтальной оси отложены результаты измерений, а по вертикальной—частоты, с которыми следовало бы ожидать встретить их в бесконечно большой совокупности измерений. Математическое ожидание или «истинное» среднее обозначается параметром μ . Среднее квадратичное отклонение или «истинное» квадратичное отклонение

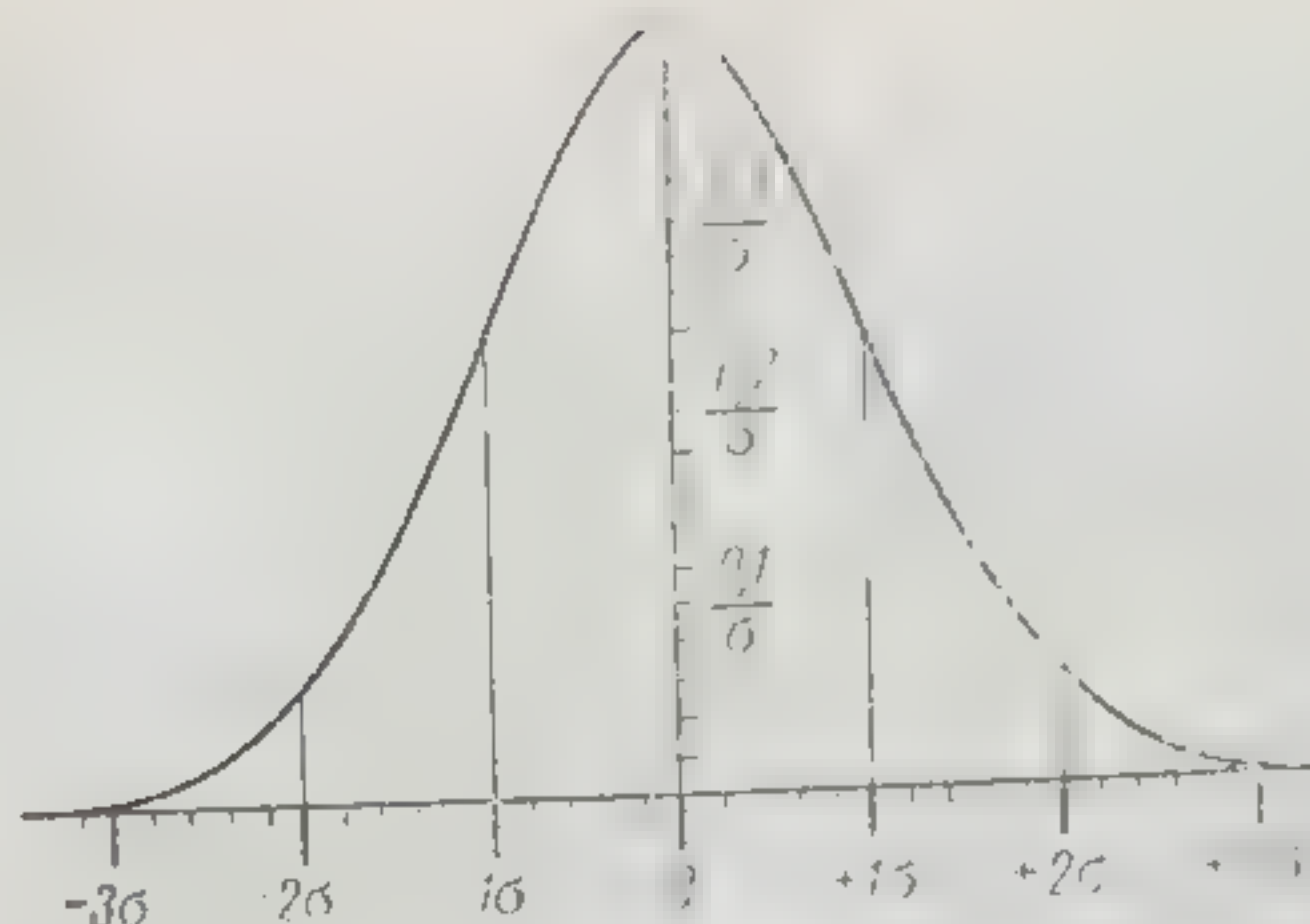


РИС. 11-6.

Нормальная кривая

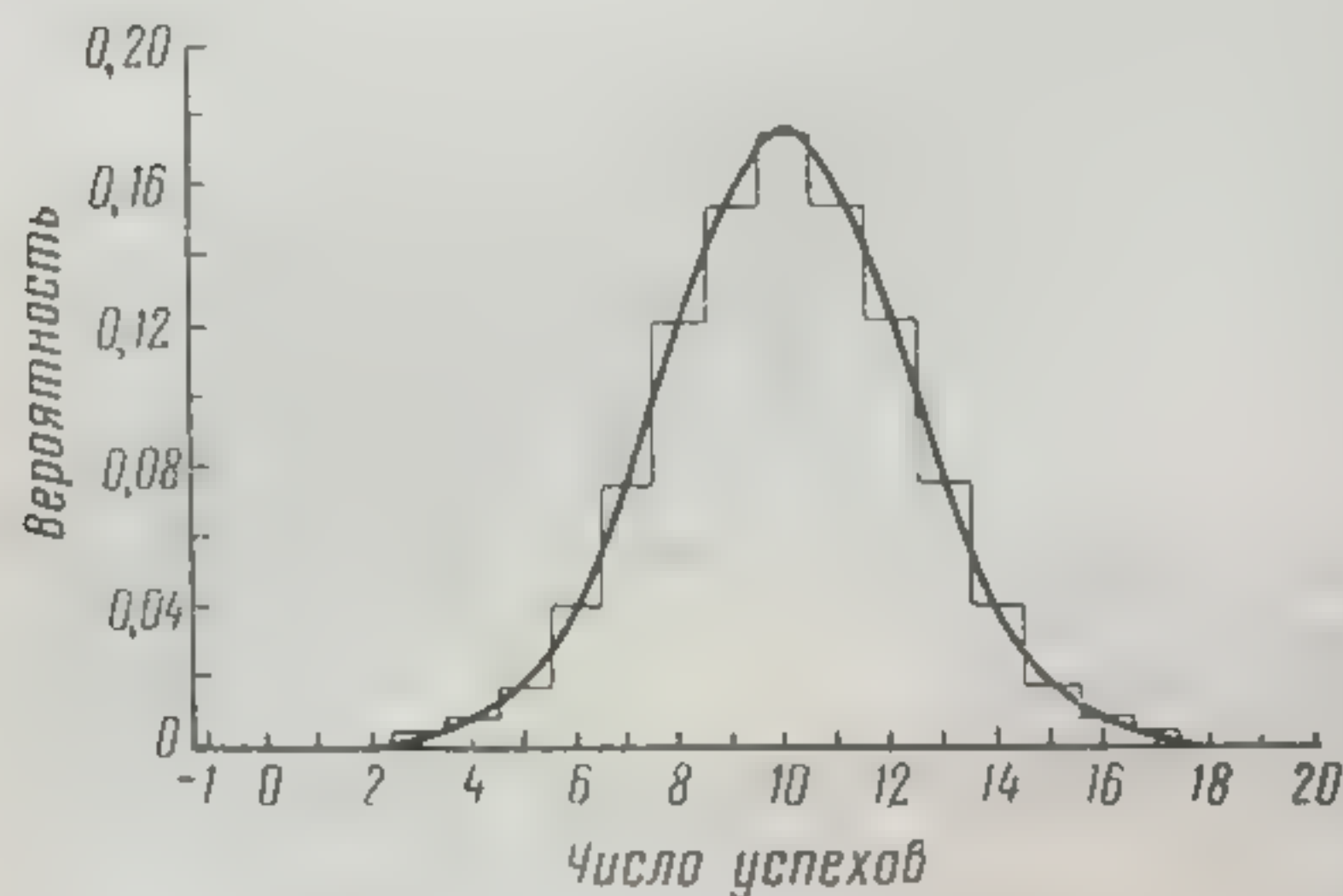


РИС. Д-7.

Гистограмма вероятностей различных чисел успехов для биномиального распределения ($N=20$, $p = 1/2$) и нормальная кривая с теми же μ и σ .

рисунке гладкая кривая — это нормальная кривая, имеющая то же среднее значение и то же квадратичное отклонение, что и гистограмма. При $p = 1/2$ чем больше размер выборки, тем больше будет число различных результатов, которые может содержать данная выборка, и тем ближе будет график вероятности успехов к нормальной кривой. Поэтому при неограниченном увеличении N число возможных результатов также неограниченно увеличивается. Таким образом, мы имеем здесь пример непрерывной переменной, про которую можно сказать, что ее значения распределены нормально.

Б. Ожидаемое распределение выборки из нормального распределения

1. Распределение в единичной выборке

Если получена очень большая выборка из совокупности, описываемой нормальной кривой, то элементы этой выборки будут распределены по кривой, напоминающей нормальную. Вероятность того, что любое данное значение X получено из гипотетической совокупности со средним значением μ и квадратичным отклонением σ_x , можно выразить через величину τ , вычисляемую по формуле

$$\tau = \frac{X - \mu}{\sigma_x}$$

обозначается строчной греческой буквой сигма (σ). Известно, что около $2/3$ всех результатов измерений лежат на нормальной кривой между σ и средним значением, а около 95% всех результатов лежат между 2σ и средним (т. е. в интервале $\mu \pm 2\sigma$). Строго говоря, отдельные «измерения», т. е. величины, которые изображаются нормальной кривой, также являются параметрами.

Нормальная кривая и биномиальное распределение. Пусть сделано бесконечно большое число выборок с $N=20$ и $p=1/2$. В этом случае точная вероятность получения различного числа успехов будет выражаться биномиальным распределением, изображенным в виде гистограммы на рис. Д—7. На этом рисунке каждый класс успехов изображается столбиком, высота которого пропорциональна частоте данного класса. Заметим, что все возможные результаты 20 наблюдений можно расклассифицировать только 21 способом (от 0 до 20 успехов), так что в данном случае мы имеем дело с 20 дискретными переменными. Изображенная на том же

Если абсолютная величина t равна 1,96, то соответствующая вероятность для X равна 0,05. Поскольку в распределении, характеризуемом предпологаемым μ и σ_x , ровно 5% величин X приводят к абсолютным значениям t , большим или равным 1,96, мы отвергаем нулевую гипотезу, если X дает для t величину, равную или превышающую 1,96.

Уравнение, связывающее t и X , можно переписать в виде $X = \mu + t\sigma_x$. Из этого выражения следует, что любое данное значение элемента выборки равно математическому ожиданию («истинному» среднему) плюс расстояние до этого среднего, измеряемое величиной $t\sigma_x$, где t равно числу σ_x , которые отделяют X от среднего ($[\sigma_x]^2$ называется дисперсией).

Пусть нас интересует высота злака (округленная до ближайшего целого дюйма). Предположим, что $\mu = 50$ дюймов и $\sigma_x = 4$ дюйма. Этой информации вполне достаточно для описания свойств нормально распределенной совокупности злаков. Высота одного из растений оказалась равна 40 дюймам. Вычисляя величину t , находим

$$\frac{40-50}{4} = \frac{10}{4},$$

что $> 1,96$. Поскольку $p < 0,05$, мы отвергаем нулевую гипотезу и можем сделать вывод, что измеренное растение с 5%-ным уровнем значимости не может принадлежать к теоретической совокупности с $\mu = 50$ и $\sigma_x = 4$.

2. Ожидаемое распределение средних значений для групп выборок

Выборочное среднее арифметическое или среднее по выборке обозначается \bar{X} (читается « X с чертой») и равно среднему, полученному в результате сложения всех величин X и деления на N , т. е.

$$\bar{X} = \frac{1}{N} \sum x,$$

Если задана совокупность, описываемая средним значением μ и квадратичным отклонением σ_x , то можно кое-что сказать о разбросе величин \bar{X} , ожидаемом для очень большого числа выборок размера N , сделанных из данной совокупности. Если сделать много выборок, то окажется, что величины \bar{X} подчиняются нормальному распределению с теоретическим средним, равным μ , и квадратичным отклонением $\sigma_{\bar{x}}$.

$$\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sigma_x^2}{N}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{N}}.$$

Поскольку $\sigma_{\bar{x}}$ меньше σ_x в \sqrt{N} раз, оно позволяет различать гораздо меньшие ошибки, чем σ_x . При $N \geq 10$ распределение \bar{X} будет очень близко к нормальному, если только распределение самих величин X не слишком сильно отличается от нормального. Поэтому, если известны μ и σ_x , то можно легко найти и распределение \bar{X} (характеризуемое величиной $\sigma_{\bar{x}}$). Надо только провести соответствующие вычисления.

В научных работах средняя ошибка $s_{\bar{x}}$ или $\sigma_{\bar{x}}$ часто приводится в виде $\bar{X} \pm s_{\bar{x}}$ или $\bar{X} \pm \sigma_{\bar{x}}$ и относится к надежности выборочного среднего. С другой стороны, s_x и σ_x — это квадратичные отклонения, и когда они приводятся в виде $X \pm s_x$ или $X \pm \sigma_x$, они относятся к изменчивости результатов одного наблюдения.

3. Проверка гипотез относительно μ

а) τ -критерий. Пусть для $N = 100$ \bar{X} оказалось равным 68,03. Мы хотим проверить с 5% уровнем значимости нулевую гипотезу, согласно которой $\sigma_x = 3$ и $\mu = 67,15$. В данном случае

$$\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{9}{100}} = 0,3; \quad \tau = \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} = \frac{68,03 - 67,15}{0,3} = \frac{0,88}{0,3},$$

что больше 1,96. Следовательно, гипотеза отвергается.

б) t -критерий. Часто бывает нужно проверить некоторое гипотетическое значение μ при неизвестных σ_x и $\sigma_{\bar{x}}$. В таком случае обычно используют наилучшую возможную оценку для σ_x . Эта весьма полезная приближенная величина представляет собой *квадратичное отклонение выборки* s_x . Величину s_x можно найти по следующим формулам:

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}}, \quad \text{заметьте, что } s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_x^2}{N}}.$$

Если вместо $\sigma_{\bar{x}}$ подставить $s_{\bar{x}}$, то выражение

$$\frac{\bar{X} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} \quad \text{перейдет в } \frac{\bar{X} - \mu}{\sqrt{s_x^2/N}} = t.$$

(Когда мы работаем с величиной $\sigma_{\bar{x}}$, в результате получается τ , а когда вместо $\sigma_{\bar{x}}$ подставляют $s_{\bar{x}}$, то получающуюся величину принято называть t .) Если величина t окажется слишком большой, то исходную гипотезу о μ следует отвергнуть. Решение принять или отвергнуть нулевую гипотезу зависит от числа степеней свободы. В случае, когда σ_x оценивается по одной выборке, это число равно $N - 1$. На графике Д-3 для различного числа степеней свободы изображены вероятности того, что t отличается от 0 в любую сторону на величину, большую или равную наблюдаемой. Если $\bar{X} = 68,03$, предполагаемое $\mu = 67,15$, $s_x = 3,24$ и $N = 9$, то $t = 0,81$. Для случая 8 степеней свободы $p > 0,05$. Следовательно, гипотетическое значение μ принимается.

в) *Доверительные интервалы для μ* . Допустим, мы решили работать с 5% уровнем значимости. Если σ_x известно, то 95% доверительный интервал для $\mu = \bar{X} \pm 1,96 \sigma_x$ или $\mu = \bar{X} \pm 1,96 \sigma_{\bar{x}}$. Если известно только s_x , то 95%-ный доверительный интервал для μ можно определить следующим образом. Пусть, как и раньше, $\bar{X} = 68,03$, $s_x = 3,24$ и $N = 9$. Найдем сначала величину t , для которой $p = 0,05$ при $N - 1$ степени свободы (при $N - 1 = 8$ это соответствует примерно 2,3). Следовательно,

$$\frac{\bar{X} - \mu}{\sqrt{s_x^2/N}} = 2,3.$$

Все величины, для которых \bar{X} отличается от μ больше чем на $2,3 s_{\bar{x}}$, отвергаются, а все величины $\bar{X} - \mu$, меньшие $2,3 s_{\bar{x}}$, принимаются с 95%-ной уверенностью. Подставляя соответствующие значения в формулу, получаем

$$\frac{\bar{X} - \mu}{1,084} = 2,3,$$

или $\bar{X} - \mu = 2,3 \times 1,08 = 2,48$. Окончательно, 95%-ный доверительный интервал для μ в данном случае есть $\bar{X} \pm 2,48$ или от 65,55 до 70,51.

г) *Сравнение \bar{X}_1 и \bar{X}_2* . Пусть взяты две выборки злаковых растений и измерена высота каждого растения. При этом получены следующие результаты:

Выборка 1. $N_1 = 9$, $\bar{X}_1 = 72,44$

$$\Sigma (\bar{X}_1 - X_1)^2 = 65,70.$$

Выборка 2. $N_2 = 10$; $\bar{X}_2 = 70,30$

$$\Sigma (X_2 - \bar{X}_2)^2 = 69,50.$$

Нужно проверить нулевую гипотезу, согласно которой эти две выборки имеют одинаковые μ и σ_x . Наилучшая оценка неизвестного σ_x есть S_x . Для двух рассматриваемых выборок ее можно вычислить по следующей формуле

$$S_x = \sqrt{\frac{\Sigma (X_1 - \bar{X}_1)^2 + \Sigma (X_2 - \bar{X}_2)^2}{(N_1 - 1) + (N_2 - 1)}} = \frac{65,70 + 69,50}{8 + 9} = 2,82.$$

Нетрудно получить, что величина $S_{\bar{x}}$ в данном случае равна 1,29, поскольку известно, что

$$S_{\bar{x}} = S_x \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}.$$

Величину t можно найти теперь из условия

$$\frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{x}}} = \frac{72,44 - 70,30}{1,29} = 1,66.$$

Поскольку каждое \bar{X} было получено из одной выборки, число степеней свободы равно $(N_1 - 1) + (N_2 - 1) = 17$. Так как $p > 0,1$, нулевая гипотеза принимается и можно сделать вывод, что с 5%-ным уровнем значимости рассматриваемые средние статистически не различаются. Если при таком вычислении получится величина t , не согласующаяся с исходной гипотезой, то эти две выборки должны отличаться либо по μ , либо по σ_x , либо по обоим этим величинам.

4. Мощность критерия

При проверке параметра или частоты встречаются два типа ошибок; один из них мы уже обсуждали. Ошибки этого типа связаны с тем, что в 5 случаях из 100 мы отвергаем правильную гипотезу (при работе с 95%-ным доверительным уровнем, или 5%-ным уровнем значимости). Это необходимо для того, чтобы иметь возможность отвергать неправильные гипотезы. Другой вид ошибок — это незаконное принятие гипотезы. Пусть $f = 0,45$ и $N = 100$. Проверяется гипотеза о том, что $p = 1/2$. И найдено, что с 5%-ным уровнем она может быть принята. Однако в действительности p может лежать всюду между 0,35 и 0,55 (см. рис. 1—2). Если p не равно 0,5, а лежит где-то между 0,35 и 0,55, то, возможно, принятая гипотеза неверна.

В данном случае критерий обладает мощностью, достаточной лишь для того, чтобы отвергнуть неправильные гипотезы, допускающие $p < 0,35$ или $> 0,55$. Если бы $N = 1000$, а $f = 0,45$, разрешающая сила критерия была бы больше. С 5%-ным уровнем можно было бы отвергнуть любую гипотезу, допускающую $p < 0,42$ или $> 0,47$. Прежде чем набирать статистику, нужно определить, есть ли в вашем распоряжении критерий, достаточно мощный, чтобы различить альтернативные гипотезы.

Пусть, по генетическим соображениям, мы хотим проверить, удовлетворяет ли полученная на опыте выборка ожидаемому соотношению 3 : 1. Допустим, эта гипотеза оказалась приемлемой. Но если теоретическое отношение 1 : 1 или 2 : 1 также приемлемо, то критерий оказывается слишком слабым и едва ли может быть полезен при описании природы рассматриваемых генетических явлений.

Один из способов повысить значимость критерия состоит в увеличении N . Другой путь — изменить доверительный уровень. При 10%-ном уровне значимости «мощность» критерия больше, чем при 5%-ном уровне,

но при этом пропорционально увеличивается вероятность того, что будет отвергнута правильная гипотеза. Если только нет каких-либо специальных обстоятельств, генетики обычно работают с 5%-ным уровнем значимости и повышают мощность критерия за счет увеличения N . Напомним, однако, что величина s или σ уменьшается при увеличении N как квадратный корень из N , так что четырехкратное увеличение N уменьшит квадратичное отклонение только в 2 раза.

Задачи

Д.35. Пусть $\sigma_x = 8$; $N = 265$; $\bar{X} = 12$. Проверьте с 5%-ным уровнем значимости гипотезу, что $\mu = 11$.

Д.36. $\sigma_x^2 = 412$; $N = 53$, $\bar{X} = 142$. Проверьте с 5%-ным уровнем значимости гипотезу, что $\mu = 135$.

Д.37. Чему равен 95%-ный доверительный интервал для μ при $\sigma_x = 4$, $N = 100$, $\bar{X} = 35$.

Д.38. Дана следующая выборка: 1, 3, 4, 5, 5, 5, 5, 6, 8. Вычислите \bar{X} , s_x и $s_{\bar{x}}$.

Д.39. Новый антибиотик проверялся на больных воспалением легких. Были получены следующие результаты: из больных, принимавших антибиотик, 64 выжило и 26 умерло (смертность 28,9%). Из не получавших антибиотик 36 выжили и 24 умерли (смертность 40%). Проверьте гипотезу о том, что лечение неэффективно.

Д.40. Из некоторой нормальной совокупности сделана случайная выборка, состоящая из 6 наблюдений. Она выглядит следующим образом: 0, 2, 6, 6, 8, 14. Проверьте гипотезу о том, что для популяции в целом среднее значение, μ , равно 10. Пользуйтесь 5%-ным уровнем значимости.

Д.41. Нормальные ячменные зерна подвергнуты рентгеновскому облучению и после этого посеяны. У 55 из 400 обследованных ростков обнаружены заметные мутации. Проверьте гипотезу о том, что истинная частота мутаций при этой дозе равна 10%.

Д.42. Обозначим длину колоса пшеницы через x (дюймов). Объясните точно, что означают слова «вероятность того, что x меньше 7, равна 0,05».

Д.43. Из некоторой мутантной породы мышей сделана выборка, содержащая 25 мышей. Предполагается, что длины этих мышей распределены нормально. \bar{X} оказалось равным 60 мм и S_x равно 10 мм. а) Проверьте с 5%-ным уровнем значимости гипотезу, что μ равно 61 мм. б) Объясните, что значит «5%-ный уровень значимости» в этом эксперименте.

Д.44. Используя данные П.43, найдите 95%-ные доверительные пределы для $\mu = 61$ мм. Объясните практическое значение Вашего результата.

Д.45. Получены следующие данные:

| Выборка 1 | | Выборка 2 | |
|-----------|------|-----------|------|
| $N=10$ | | $N=10$ | |
| +3,4 | -0,1 | +5,5 | -0,1 |
| +0,7 | +3,7 | +1,9 | +4,4 |
| -1,6 | +0,8 | +1,8 | +1,6 |
| -0,2 | 0,0 | +1,1 | +4,6 |
| -1,2 | +2,0 | +0,1 | +3,4 |

Определите, являются ли эти две выборки статистически различными.

Д.46. При каких условиях можно пользоваться для определения величин t таблицей t ?

ЛИТЕРАТУРА

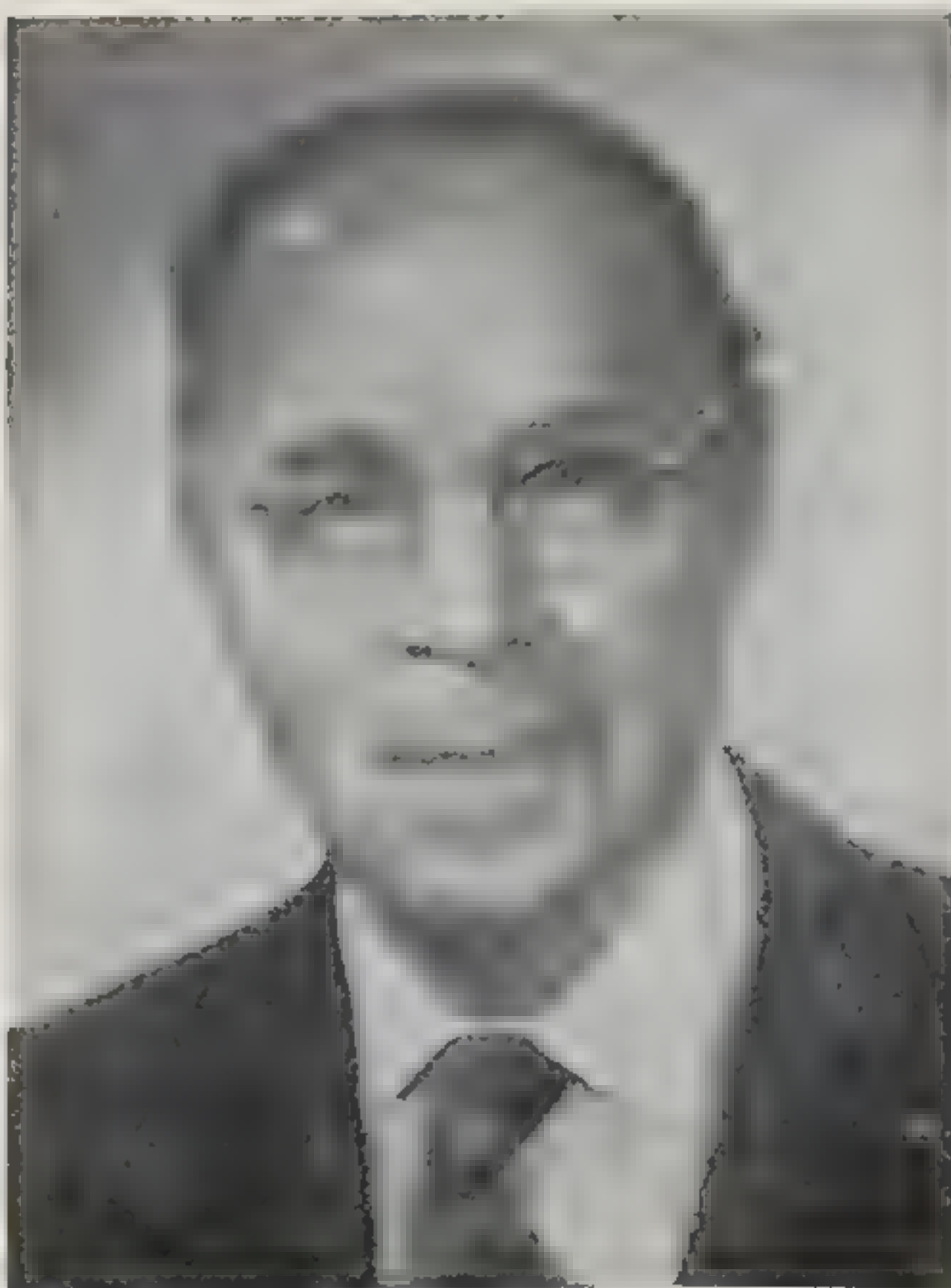
- Бейли Н. Статистические методы в биологии М., ИЛ, 1962.
 Falconer D. S. Introduction to Quantative.— Genetics. N. Y., Ronald Press, 1961.
 Kempthorne O. An Introduction to Genetic Statistics. N. Y., Wiley a. Sons, 1957.
 Levene. H. Statistical Inferences in Genetics. In: E. W. Sinnott, L. C. Dunn, and Th. Dobzhansky (Eds.) Principles of Genetics. 5th ed. N. Y., 1958.



ГРЕГОР МЕНДЕЛЬ
(1822—1884)



ТОМАС ГЕНТ МОРГАН
(1866—1945)



ГЕРМАН ДЖОЗЕФ МЕЛЛЕР
(1890—1967)



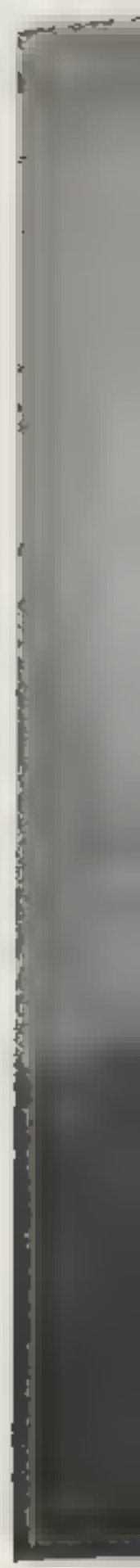
МОРИС УИЛКИНС
(1916 г.)



АРТУР КОРНБЕРГ
(1918 г.)



ДЖОРДЖ УЭЛАС БИДЛ
(1903 г.)



ЭДВА
(1903 г.)



ЭДВАРД ЛОУРИ ТАТУМ
(1909 г.)



ДЖОШУА ЛЕДЕРБЕРГ
(1925 г.)



ДЖЕЙМС ДЬЮИ УОТСОН
(1928 г.)

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение I

ЧАСТЬ ПИСЬМА ГРЕГОРА МЕНДЕЛЯ НЭГЕЛИ

Высокопочтимый господин!

Приношу искреннюю благодарность за любезно присланные труды. Больше всего привлекло мое внимание работы «Образование бастардов в мире растений», «О производных растительных бастардах», «Теория образования бастардов», «Промежуточные межвидовые формы растений», «Систематический обзор ястребинок в отношении промежуточных форм и границ видов». Серьезная разработка учения о бастардах с современных научных позиций мне кажется в высшей степени желательной. Еще раз благодарю Вас!

Относительно статьи, которую Ваше высочородие любезно приняли, мне кажется необходимым добавить следующее. Опыты, о которых в ней говорится, проводились с 1856 по 1863 г. Мне было неизвестно, что полученный результат нелегко согласовать с нынешним состоянием науки и что в этих условиях опубликование одного изолированного эксперимента вдвойне рискованно как для экспериментатора, так и для дела, им защищаемого. Мои усилия были направлены прежде всего на то, чтобы сделанные на *Pisum* наблюдения проверить опытами на других растениях. При еще большем числе скрещиваний, предпринятых в 1863 и 1864 гг., я убедился, что нелегко найти растения, которые пригодны для обширного ряда опытов и что в неблагоприятном случае могут пройти годы без достижения желаемого мною результата. Я старался организовать контрольные опыты, для чего изложил на собраниях местного Общества естествоиспытателей опыты с *Pisum*. Как и следовало ожидать, я столкнулся с весьма разноречивыми мнениями, однако никто не предпринял, насколько мне известно, повторения опытов. Когда в прошлом году мне предложили опубликовать доклад в трудах Общества, я согласился после того, как еще раз просмотрел записи опытов различных лет и не обнаружил никакого источника ошибки. Посланная статья является точной копией конспекта упомянутого доклада, отсюда краткость изложения, требуемая вообще для докладов Общества.

Для меня не явилось неожиданностью, что Ваше высочородие будет говорить о моих опытах с недоверчивой осторожностью; в подобном случае я бы поступил так же. Два места в Вашем письме кажутся мне особенно важными, и я не могу не упомянуть о них. Первое касается вопроса, можно ли делать вывод о полной константности, если бастард Aa производит растение A , которое в свою очередь снова дает только A .

На это я позволю себе заметить, что я как эмпирик под константностью понимаю не что иное, как сохранение свойств в течение наблюдаемого периода. Мои данные о том, что среди потомков гибридов часть остается константной, могут распространяться только на те поколения, которые находятся под наблюдением, и не далее. На двух поколениях были проведены опыты с большим числом растений. Начиная с третьего поколения, количество пришлось ограничить из-за нехватки места, а именно таким образом, что в дальнейшем под наблюдением находились для каждого из семи опытов только отдельные растения из тех, которые во втором

поколении остались константными, и из тех, которые варьировали. Наблюдение продолжалось до 4—6 поколений. Отдельные растения из константной группы обоих опытов наблюдались по четвертое поколение включительно. Далее, я не могу не упомянуть о том случае, когда одна разновидность, чьи исходные родительские формы различались по четырем признакам, на протяжении 6 поколений не варьировала. А именно в 1859 г. из первого поколения гибридов был получен весьма плодоносный отпрыск с большим количеством вкусных семян. Так как его потомки в последующие годы сохранили хорошие свойства и оставались такими же, эта разновидность разводилась на огороде и ежегодно культивировалась по 1865 г. включительно во многих экземплярах. Исходными растениями являлись *bcDg* и *BCdG*.

B белок желтый

C семенная кожура серовато-коричневая

D боб выпуклый

G ось длинная

b белок зеленый

c семенная кожура белая

d боб с перехватами

g ось короткая

Упомянутый отпрыск был *BcDG*.

Окраска белка могла быть исследована только у тех растений, которые предназначались для получения семян, так как бобы остальных растений собирались недозрелыми. В этих растениях ни разу не встретилась зеленая окраска белка, также не наблюдалась лилово-красная окраска цветка (признак коричневой семенной кожуры), перехваты боба или короткая ось.

Таковы мои наблюдения. Не берусь судить, можно ли отсюда сделать окончательный вывод о возникновении константности; признаюсь, однако, что я склонен рассматривать расхождение исходных признаков *Pisum*, происходящее у потомков гибридов, как абсолютное и устойчивое. Отпрыски гибридов обладают лишь одним из обоих исходных признаков или их гибридной формой; постепенных переходов к исходным признакам или же последовательного приближения к ним я не наблюдал. Ход развития состоит попросту в том, что в каждом поколении непосредственно из гибридной формы отдельно и неизменными возникают оба исходных признака и ничто не говорит о каком-либо заимствовании или унаследовании друг от друга. Чтобы привести лишь один пример, я хочу сослаться на посланные Вам пакеты под номерами 1035—1088. Эти семена взяты от первого поколения гибрида, у которого были семена как с коричневой, так и с белой кожурой. Из коричневых семян этого гибрида произросли растения, часть которых имела только белую окраску семенной кожуры без какой-либо примеси коричневого цвета и, как я и ожидал, сохраняла то же постоянство по этому признаку, что и исходная форма.

Второе место (в Вашем письме), на котором я хотел бы остановиться, содержит слова: «Вы можете считать формулы эмпирическими, так как рациональными они не являются».

Все мои опыты над отдельными признаками приводили к тому результату, что из семян гибридов произрастают растения, из которых половина снова несет гибридные признаки (*Aa*), а в другой половине оба исходных признака (*A* и *a*) встречаются поровну. В среднем из каждых четырех растений два имеют гибридные признаки *Aa*, одно имеет исходный признак *A* и одно — признак *a*. Отсюда $2Aa + A + a$ или $A + 2Aa + a$ являются простым эмпирическим рядом развития для каждой пары различающихся признаков. Точно так же эмпирическим путем было доказано, что если в гибриде объединены два или три различающихся признака, то ряд развития представляет собой комбинацию двух или трех простых рядов. Я полагаю, что меня до сих пор нельзя было упрекнуть в том, что

я перестал опираться на мои эксперименты. Если я, наконец, распространю комбинирование простых рядов развития на любое количество различий между обоими исходными растениями, то тем самым я вступлю на рациональный путь. Я считаю это допустимым, так как во время предыдущих экспериментов я нашел подтверждение тому, что развитие каждого двух различающихся признаков происходит независимо от других отличий. Что касается данных о различиях зародышевых пузырьков и пыльцевых клеток, образованных у гибридов, то они тоже опираются на опыты. Эти и подобные им опыты по оплодотворению клеток кажутся мне важными, так как я надеюсь по их результатам объяснить наблюдаемое развитие гибридов *Pisum*. Эти опыты надо проконтролировать путем повторения в первую очередь.

Я весьма сожалею, что не в состоянии прислать Вашему высочеству семена тех разновидностей, которые Вы хотели бы получить. Как я упоминал ранее, описываемые опыты проводились по 1863 г. включительно; в этом году они были прекращены, чтобы получить место и время для культивирования других опытных растений. Семян от этих опытов больше нет. Был продолжен только один эксперимент по различию во времени цветения, и от него еще сохранились семена из урожая 1864 г. Это последние, собранные мною семена, так как упомянутый опыт в следующем году пришлось прекратить из-за сильных опустошений, произведенных гороховым жуком *Bruchus pisi*. Это насекомое, которое в предыдущие годы появлялось лишь на отдельных растениях, в 1864 г. причинило немалый ущерб, а в следующем году появилось в таком количестве, что осталась неповрежденной лишь четвертая или пятая часть семян. В окрестностях Брюнна пришлось в последние годы совершенно прекратить посадку гороха. Из сохранившихся семян некоторые можно использовать; в частности, среди них имеются разновидности, касательно которых я предполагаю, что они не будут варьировать; они происходят от гибридов, в которых были объединены 2, 3 и 4 различающихся признака. Семена взяты от членов первого поколения, следовательно, от растений, которые произошли непосредственно из семян начальных гибридов.

Если бы просьба Вашего высочества не соответствовала моим желаниям, я бы, очевидно, подумал, прежде чем послать эти семена для опытов. Я боюсь, что частично они утратили всхожесть, кроме того они происходят от того периода, когда повсюду находили *Bruchus pisi*, который, как я полагаю, мог занести пыльцу. И наконец, я должен еще раз упомянуть о том обстоятельстве, что растения были предназначены для исследования в отношении различия во времени цветения. Конечно, при сборе семян учитывались и остальные различия, но, вероятно, это делалось не с такими предосторожностями, как в случае, предназначенном для главного опыта. Номера пакетов вместе с обозначениями, выписанные на отдельном листочке, соответствуют тем, которые я при сборе семян надписывал карандашом на конверте для каждого растения. Доминирующие признаки обозначены: *A, B, C, D, E, F, G*, и я позволил себе вначале указать на их двойное значение. Рecessивные признаки имеют обозначения *a, b, c, d, e, f, g*; они должны остаться неизменными и в последующих поколениях, причем от семян, взятых от растений с исключительно recessивными признаками, мы должны ждать совершенно такие же растения (в отношении рассматриваемых признаков).

Для избежания возможной ошибки в обозначении, я дружески прошу Вас учитывать номера пакетов с семенами, поскольку они совпадают с номерами моей описи. В каждом пакете находятся семена только от одного растения.

Некоторые из имеющихся разновидностей пригодны для опытов с половыми клетками, результат которых мы сможем увидеть еще этим летом. Для этого я бы рекомендовал круглые желтые семена из пакетов:

715, 730, 736, 741, 742, 745, 756, 757 и, кроме того, зеленые угловатые семена из пакетов 712, 719, 734, 737, 749, 750. Повторные опыты подтвердили, что при опылении растения с зелеными семенами тем растением, которое имеет желтые семена, белок опыленного семени теряет зеленую окраску и приобретает желтую. То же самое относится к форме семян. Если опылить растения с угловатыми семенами теми, у которых семена круглые или кругловатые, то опыленные семена всегда получают круглую или кругловатую форму. Из изменений, которым подвергаются цвет и форма семян в результате опыления чужой пылью, можно сделать соответствующий вывод о свойствах пыльцы, предназначенной для опыления.

Пусть V означает желтую окраску белка, b — зеленую, A — круглую форму семени, a — угловатую.

Если цветки растений, семена которых при самоопылении зеленые и угловатые, при опылении чужой пылью сохраняют зеленый цвет и угловатость семян, то оба признака растения, дающего пыльцу, равнозначны — ab .

Если изменяется форма цветка, то пыльца взята от растения Ab .

Если изменяется цвет цветка, то пыльца взята от растения aB . Если изменяется и цвет и форма цветка, то пыльца взята от растения AB .

В вышеуказанных пакетах находятся семена, полученные от гибридов $ab + AB$: круглые и желтые, круглые и зеленые, угловатые и желтые, угловатые и зеленые. Для эксперимента наиболее пригодны круглые и желтые семена. Среди них могут встретиться виды $AB, ABb, AaB, AaBb$; следовательно, возможны четыре случая, когда растения, выращенные из зеленых угловатых семян, опыляются пылью растений, выращенных из угловатых и желтых семян, а именно:

- I. $ab + AB$
- II. $ab + ABb$
- III. $ab + AaB$
- IV. $ab + AaBb$

Если правильно предположение, что гибриды образуют столько пыльцевых клеток, сколько существует постоянных видов комбинаций, то

| | | | | | |
|--|--------|---|---|---|---------------------|
| растения AB дают пыльцу со свойствами AB | | | | | |
| » | ABb | » | » | » | AB и Ab |
| » | AaB | » | » | » | AB и aB |
| » | $AaBb$ | » | » | » | AB, Ab, aB и ab |

В соответствии с этим оплодотворяются:

| | | | | |
|------|----------------------|------|---------|-----------------------|
| I. | зародышевые пузырьки | ab | пыльцой | AB |
| II. | » | » | ab | » AB и Ab |
| III. | » | » | ab | » AB и aB |
| IV. | » | » | ab | » AB, Ab, aB и ab |

От этих оплодотворений получают следующие возможные разновидности:

- I. $AaBb$
- II. $AaBb$ и Aab
- III. $AaBb$ и aBb
- IV. $AaBb, Aab, aBb$ и ab

Если различные виды пыльцы образуются в равном количестве, то, следовательно:

- I) все семена окажутся круглыми и желтыми;
- II) половина — круглые и желтые, половина — круглые и зеленые;
- III) половина — круглые и желтые, половина — угловатые и желтые;

IV) четвертая часть — круглые и желтые,

» » круглые и зеленые,

» » угловатые и желтые,

» » угловатые и зеленые.

Так как, далее, между AB , ABb , AaB , $AaBb$ наблюдается соотношение $1 : 2 : 2 : 4$, то в среднем на каждые 9 растений, выращенных из круглых желтых семян, приходится $AaBb$ — 4 раза, ABb и AaB — каждое по 2 раза и AB — 1 раз и, таким образом, четвертый тип встречается в 4 раза чаще, чем первый, и в 2 раза чаще, чем второй и третий.

Если, наоборот, опылить растения, выращенные из упомянутых круглых и желтых семян, пылью растений из угловатых зеленых семян, то успех будет точно такой же, при условии, что зародышевые пузырьки образуются в том же соотношении и с теми же свойствами, как было указано для пыльцы.

Подобного опыта я сам не проводил; полагаю, однако, судя по успеху других сходных опытов, что можно с уверенностью рассчитывать на указанный результат.

По тому же методу следовало бы поставить отдельные опыты для каждого из обоих признаков семян, для чего пригодны все круглые семена, которые появились на одном растении одновременно с угловатыми, а также все желтые, появившиеся вместе с зелеными. Если, например, опылить растения с зелеными семенами пылью от растений с желтыми семенами, то полученные семена должны либо: 1) все быть желтыми; 2) наполовину желтыми и наполовину зелеными, так как растения, полученные от желтых семян, относятся к видам B и Bb . Если, далее, B и Bb имеют численное соотношение $1 : 2$, то второй случай встретится вдвое чаще, чем первый.

Для остальных признаков опыты могут проводиться по такому же методу, однако результат можно получить только в следующем году.

Опыты продвигаются медленно, да иначе и не может быть. Сначала необходимо терпение, но позже дело пойдет лучше, когда одновременно будет проводиться много опытов. С начала весны до осени ежедневно напряженно ждешь нового, и необходимы огромные усилия, чтобы защитить растения. Если мои опыты будут способствовать в какой-то степени решению проблемы, я буду вдвойне счастлив.

Примите выражение искреннего уважения от преданного Вам Г. Менделя.

(Старый Брюнн, монастырь Св. Фомы)
Брюнн, 18 апреля 1867 г.

Приложение II

ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ ФИЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Т. МОРГАН

Нобелевская лекция, 1934 г.

Учение о наследственности, называемое теперь генетикой, претерпело в настоящем веке такое исключительное развитие как в теоретической, так и в практической области, что в короткой речи не представляется возможным дать даже краткий обзор всех его важнейших достижений. В лучшем случае я смогу лишь выдвинуть на обсуждение несколько наиболее существенных вопросов.

Так как группа исследователей, с которыми я работал в течение 20 лет, интересовалась главным образом хромосомным механизмом наследственности, то я сначала дам краткий очерк взаимоотношений между фактами наследственности и теорией гена. Затем я хотел бы обсудить одну из физиологических проблем теории гена и, наконец, сказать несколько слов о применении генетики в медицине.

Современная теория генетики берет свое начало с первых лет текущего столетия, когда была открыта давно затерянная работа Менделя, оставшаяся незамеченной в течение 35 лет. Данные, полученные де Фризом в Голландии, Корренсом в Германии и Чермаком в Австрии, показали, что законы Менделя не ограничиваются садовым горохом, а применимы и к другим растениям. Одним или двумя годами позже работы Бэтсона и Пённета в Англии и Кэно во Франции сделали очевидным, что эти же законы применимы и к животным.

В 1902 г. Уильям Сеттон, молодой студент, работавший в лаборатории Е. В. Вильсона, окончательно установил, что общеизвестное поведение хромосом во время созрания половых клеток позволяет объяснить характер разделения наследственных единиц, постулированный теорией Менделя.

Открытие механизма, способного объяснить первый и второй законы Менделя, имело выдающиеся последствия для теории генетики, особенно же для открытия дальнейших законов, ибо признание механизма, который может быть видим и прослежен, требует, чтобы всякое расширение менделевской теории было согласовано с этим признанным механизмом. Кроме того, давно были известны случаи кажущихся исключений из менделевских законов. Если бы этот механизм не был известен, такие случаи могли бы привести к совершенно необоснованным изменениям менделевских законов и даже на первый взгляд умалить их всеобщее значение. Теперь мы знаем, что одни из этих «исключений» обусловлены открытыми в последнее время свойствами хромосомного механизма, другие же — определенными неправильностями в нем.

Мендель не знал процессов, происходящих при образовании пыльцы и яйцевых клеток, которые могли бы послужить основой для его первого предположения, что наследственные элементы разъединяются в половых клетках таким образом, что каждая зрелая клетка получает только по одному элементу каждого сорта. Но Мендель доказал правильность этого предположения при помощи проверочного опыта. Его анализ был замечательным образцом рассуждения, которое было подтверждено экспериментом, проведенным по всем требованиям науки.

Во времена Менделя фактически не представлялось возможным объективно показать основной механизм, ответственный за распределение

наследственных элементов в половых клетках. Подготовка к этому открытию продолжалась в течение всех 35 лет, отделяющих годы 1900 и 1865, когда была опубликована работа Менделя. Именно в этот период выдвинулись имена выдающихся европейских цитологов, исследовавших поведение хромосом при созревании половых клеток. В значительной степени в результате их работы стало возможным в 1902 г. сочетать хорошо известные цитологические факты с законами Менделя.

Наиболее важными добавлениями, которые были сделаны к двум законам Менделя, являются сцепление и кроссинговер. В 1906 г. Бэтсон и Пённет сообщили о двух факторах у душистого горошка, которые не расщеплялись в отношении, ожидаемом для двух пар признаков, одновременно входящих в скрещивание.

В 1911 г. у дрозофилы были найдены два гена, обнаруживавшие сцепленное с полом наследование, причем еще раньше было показано, что такие гены лежат в X-хромосомах. При наличии этих двух пар признаков во втором поколении были найдены отношения, не подтверждавшие второго закона Менделя; было сделано предположение, что в этих случаях эти отношения могут быть объяснены обменом между двумя X-хромосомами самки. Было также установлено, что чем дальше друг от друга гены таких признаков лежат в хромосоме, тем больше вероятность обмена. Это дало возможность приблизительно локализовать одни гены по отношению к другим. С дальнейшим развитием и разработкой этой идеи и по мере накопления фактов создавалась возможность показать, что гены в каждой хромосоме лежат в линейном порядке.

Двумя годами раньше (1909) бельгийский исследователь Янссенс описал явление, имеющее место при конъюгации хромосом у саламандры *Batrachoseps*, которое он истолковал как обмен, происходящий между гомологичными хромосомами. Он назвал это явление хиазмотипией; явление это занимает внимание цитологов и до нынешних дней. Наблюдения Янссенса имели своей ближайшей целью объективно подтвердить доказательство генетического обмена сцепленных генов, расположенных в половых хромосомах самки дрозофилы.

В настоящее время мы распределяем гены на графиках или картах, на которых цифры выражают расстояние каждого гена от некоторой произвольной точки, принимаемой за нуль (рис. II—1). Эти цифры дают возможность предсказать, как будет наследоваться в отношении всех других признаков какой-либо вновь появившийся признак, коль скоро для него будет определена частота перекрестов с какими-нибудь другими двумя признаками. Эта возможность предсказывать уже сама по себе оправдывает построение таких карт даже в том случае, если бы не было других доказательств локализации генов; однако в настоящее время имеются и прямые данные, подтверждающие точку зрения, согласно которой гены лежат в хромосомах в линейном порядке.

ЧТО ТАКОЕ ГЕНЫ?

Какова природа элементов наследственности, которые Мендель постулировал как чисто теоретические единицы? Что представляют собой гены? Имеем ли мы право, после того как мы локализовали гены в хромосомах, рассматривать их как материальные единицы, как химические тела более высокого порядка, чем молекулы? Откровенно говоря, все эти вопросы очень мало занимали внимание генетиков-экспериментаторов, если не считать тех беспочвенных спекуляций о природе постулируемых единиц, которые время от времени высказывались ими в печати. Среди генетиков нет согласия во взглядах на природу генов, — являются ли они реальными или абстракцией, потому что на уровне, на котором находятся современные генетические опыты, не представляет ни малейшей разницы, является ли ген гипотетической или материальной частицей. В обоих

$$\frac{dl}{dt} \frac{dt}{ds}$$



$$\frac{dl}{dt} \frac{dt}{ds}$$

$$\frac{t_1}{t_0} \frac{t_2}{t_0}$$



$$\frac{t_1}{t_0} \frac{t_2}{t_0}$$

$$\frac{t_1}{t_0} \frac{t_2}{t_0}$$

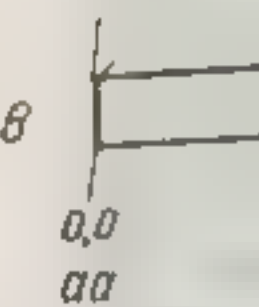


рис. 1
Генети
Одно д

случа
быть
ген пр
сомы;
к опр
перво
лично

Ме
посту
в кото
Здесь
новой
Мы
нии ге
дений

Та
ляется
ряда),
равны
с клет
же об
процес
нения
как м
ских м
писыва
образо
нам со
сложну

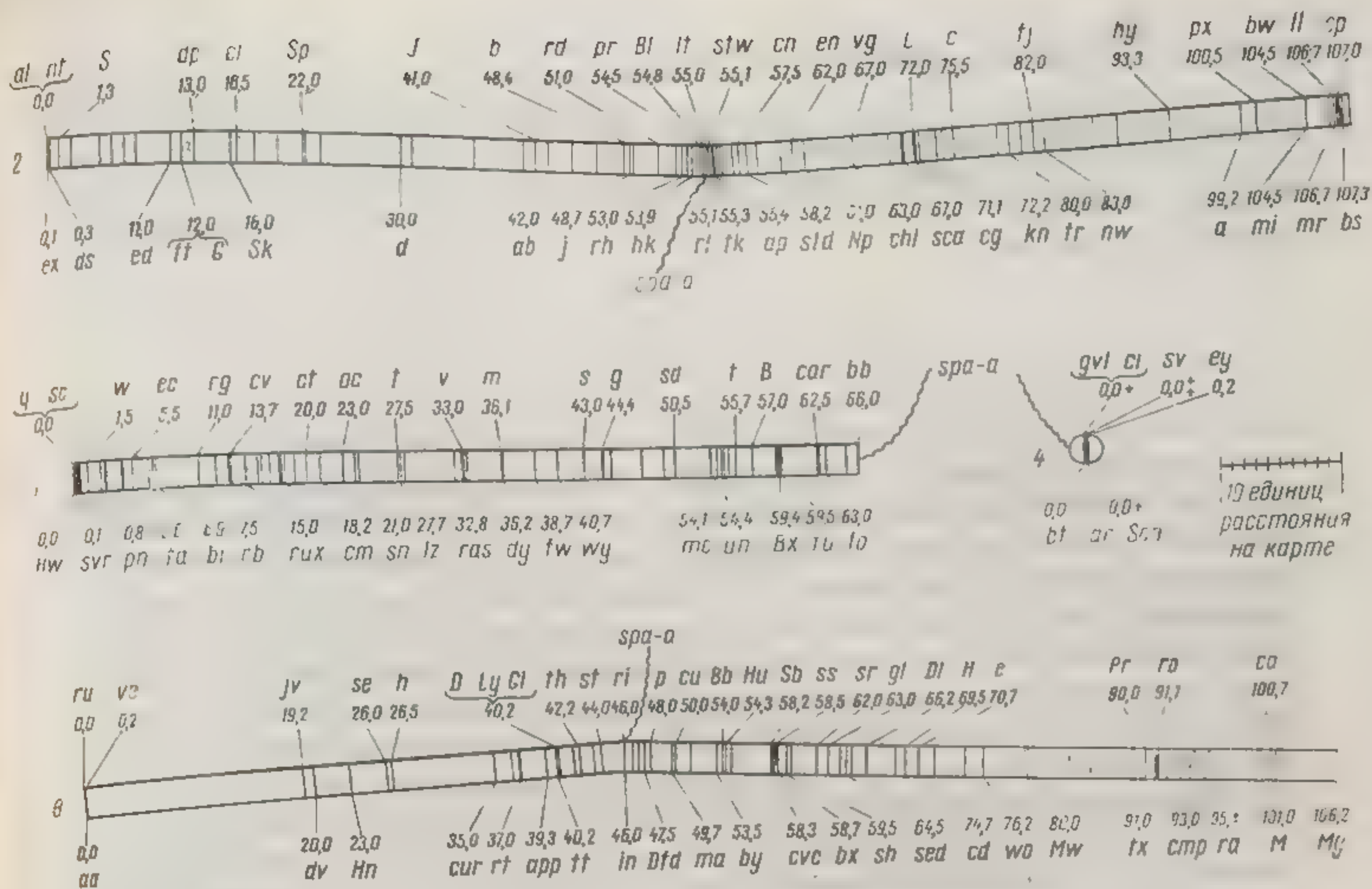


РИС. II-1.
Генетические карты всех четырех хромосом *Drosophila melanogaster* (C. Bridges).
Одно деление на масштабе соответствует одной единице расстояния на карте

случаях эта единица ассоциирована со специфической хромосомой и может быть локализована там путем чисто генетического анализа. Поэтому если ген представляет собой материальную единицу, то он есть кусочек хромосомы; если же ген — абстрактная категория, то он должен быть отнесен к определенному месту в хромосоме, причем к тому же самому, что и при первой гипотезе. Поэтому в практической генетической работе безразлично, какой точки зрения придерживаться.

Между признаками, которыми оперируют генетики, и генами, которые постулируются их теорией, лежит целое поле эмбрионального развития, в котором присущие генам свойства проявляются в протоплазме клеток. Здесь мы затрагиваем физиологическую проблему, которая является новой и чуждой для классических курсов физиологии.

Мы приписываем генам некоторые общие свойства отчасти на основании генетических данных, отчасти же исходя из микроскопических наблюдений. Мы можем сейчас рассмотреть эти свойства.

Так как хромосомы делятся таким образом, что весь ряд генов расщепляется (каждая дочерняя хромосома получает точно половину исходного ряда), то мы едва ли можем избежать вывода, что гены делятся на точно равные части. Но как именно это происходит, — неизвестно. Аналогия с клеточным делением заставляет предполагать, что и ген делится таким же образом; однако мы не должны забывать, что относительно грубый процесс клеточного деления может оказаться несовершенным для объяснения исключительно точного разделения гена на две равные части. Так как мы не знаем сколько-нибудь сравнимых явлений деления органических молекул, то мы должны, следовательно, быть осторожными в приписывании гену простой молекулярной структуры. С другой стороны, образование в органическом веществе сложной цепи молекул может дать нам со временем возможность лучше представить молекулярную или сложную структуру гена и укажет путь к пониманию способа его деления...

Приложение III

ОБРАЗОВАНИЕ МУТАЦИЙ

Г. МЕЛЛЕР

Нобелевская лекция, 1946 г.

Если, как утверждал Дарвин, адаптация живых организмов обусловлена естественным отбором, а не телеологической направленностью самого процесса изменчивости, то для того, чтобы обеспечить процесс отбора большим разнообразием, наследуемые вариации должны почти при всех условиях происходить во многих направлениях. Это, однако, в определенной степени противоречит широко распространенному мнению, отчасти поддержанному и Дарвином, что под влиянием данных внешних условий возникают, как правило, только вполне определенные наследуемые вариации. Действительно, при этом мы снова встречаемся с той же трудностью: как удастся возникнуть «соответствующим» вариациям (то есть адаптивным вариациям) в ответ на «соответствующие» условия (то есть условия, к которым эти вариации адаптированы). Более того, в этом вопросе нам не помогает и представление де Фриза о мутациях. В соответствии с этой точкой зрения существуют внезапные скачки, приводящие к полному превращению одного «элементарного вида» в другой с радикальным изменением многих признаков сразу, причем число разных, альтернативных скачков относительно невелико. Очевидно, что нельзя объяснить, как посредством таких резких скачков организмы приобрели столь рациональную внутреннюю и внешнюю организацию, или, иными словами, оказались столь полно адаптированными.

Прежние селекционеры, мыслившие в терминах химических реакций на макроскопическом уровне, если им вообще приходилось мыслить на химическом уровне, слабо понимали ультрамикроскопическую случайность процесса, вызывающего наследуемые вариации. Первые исследователи мутаций, кроме того, не увидели качественной и количественной множественности мутаций. Однако скоро результаты опытов Бауэра на *Antirrhinum* и Моргана на дрозофиле, а также разрозненные наблюдения на других видах показали существование многочисленных менделирующих мутаций, многие из которых вызывали небольшие изменения. Эти мутации происходили в разнообразных направлениях и для них не было обнаружено заметной связи между типом мутации, характером внешних условий и состоянием организма, при которых возникла эта мутация. Эти наблюдения лучше согласуются со статистическим представлением о процессе эволюции, основанном на случайностях. В каком, однако, смысле можно рассматривать события случайными. Возможно, они являются выражением скрытых сил, действующих более детерминированно. Короче говоря, было более чем когда-либо очевидно, что назрела необходимость дальнейшего изучения характера возникновения мутаций.

Если процесс возникновения мутации действительно не телеологичен, то между характером внешних условий и характером изменения не должно быть никакой связи и, что самое главное, никакой адаптивной связи. Если мутации действительно столь многочисленны и столь разнообразны, как этого требует теория естественного отбора, основная масса изменений должна быть вредной, точно так же, как произвольное изменение в сложном аппарате, сделанное вслепую, обычно вредно отражается на его работе. Многие из самых больших изменений должны быть даже полностью несовместимы с его работой или, как мы говорим, должны быть

летальны. Таким образом, как это ни странно выглядит на первый взгляд, следует ожидать, что в случае правильности теории естественного отбора большинство мутаций должно быть вредными. Следует еще ожидать, что эти в основном вредные изменения должны быть очень разнообразными по своей генетической природе.

ЧАСТОТА МУТАЦИЙ

Для того, чтобы получить данные в этом направлении, необходимо выработать специальные генетические методы, приспособленные для обнаружения мутаций, которые обычно ускользают от наблюдения. К ним относятся, во-первых, летали, во-вторых, изменения малые, но все же заметные, и, в-третьих, изменения, внешне незаметные, но в большей или меньшей степени неблагоприятно влияющие на жизнеспособность. Объяснение этих методов увело бы нас сейчас слишком в сторону. Достаточно сказать, что в них используется принцип, состоящий в том, что для начала хромосома, как мы говорим, «маркируется» одним или несколькими известными мутантными генами с заметными видимыми эффектами, для того чтобы отличить ее от другой гомологичной хромосомы. Следует ожидать, что при соответствующем размножении особи с такими отличающимися хромосомами образуется две группы заметным образом отличающихся потомков, причем в определенном соотношении. Если, однако, в одной из хромосом появится летальная мутация, ее возникновение будет отмечено отсутствием соответствующей ожидаемой группы потомков. Аналогично, мутантный ген с незаметным, но в какой-то мере вредным, хотя и не полностью летальным действием, будет обнаружен при уменьшении численности соответствующей группы потомков по сравнению с ожидаемой. Кроме того, при такой постановке опытов увеличивается вероятность обнаружения генов с очень небольшими видимыми эффектами. Действительно, малый эффект можно не заметить в одной особи, но в целой группе потомков легче обнаружить тенденцию в сторону отличий по какому-либо признаку от соответствующей группы потомков, возникшей от не-мутанта.

В первых опытах такого рода, проведенных в 1918—1919 гг. Альтенбургом и мною, частично совместно, удалось получить четкие данные о том, что у *Drosophila* летальные мутации возникают гораздо чаще мутаций, дающих видимый эффект, и что среди последних мутации со слабым проявлением встречаются гораздо чаще мутации с четким заметным эффектом, которые используются в обычной генетической работе. Большинство мутаций как четко видимых, так и со слабым проявлением обладали пониженной жизнеспособностью. Исследование генетической природы полученных мутаций с использованием новых тогда фактов о сцеплении показало, что они очень разнообразны по месту своей локализации в хромосоме. Можно было подсчитать, что спонтанно должны возникать по крайней мере сотни, а то и тысячи разных типов мутаций. В работах, сделанных гораздо позже с использованием индуцированных мутаций, было показано (в независимых опытах автора этих строк и Керкиса, а также Тимофеева-Ресовского с сотрудниками, проведенными в 1934 г.), что «невидимые» мутации, которые за счет тех или иных физиологических изменений уменьшают жизнеспособность, не являясь полностью летальными, составляют наиболее многочисленную группу из всех обнаруженных до сих пор мутаций. Таких мутаций по меньшей мере в 2—3 раза больше полных леталей. Кроме того, наверняка возникает еще столько же, если не больше, мутаций, эффект которых столь мал, что совсем не может быть обнаружен нашими сравнительно грубыми методами. Именно среди них вероятней всего обнаружить те редкие случаи, когда при данных условиях или в комбинациях с другими мутациями мутация обладает

определенным адаптивным значением. Опыты Тимофеева-Ресовского показали, однако, что даже среди более заметных видимых мутаций встречается некоторое количество таких, которые в определенных комбинациях приводят к адаптивным преимуществам в лабораторных условиях.

Сам метод обнаружения по отсутствию целой группы потомков с определенным четким признаком позволяет выявлять летали более надежно, независимо от субъективных свойств исследователя, чем нечеткие, невидимые или просто вредные мутации. К счастью встречается довольно мало промежуточных случаев, когда мутация почти полностью, но не совсем летальна. Так как летальные мутации встречаются гораздо чаще ярко выраженных видимых мутаций и могут быть объективно выявлены, оказалось возможным использовать летали в качестве меры частоты мутаций, несмотря на тот недостаток, что для обнаружения летали необходимо размножение, а не простое обследование особи, несущей мутацию. В ранее опубликованной работе мы (Альтенбург и автор этих строк) попытались не только найти количественное значение «нормальной» частоты мутаций, но и выяснить, влияют ли на частоту мутаций определенные условия, которые, как мы считали, представляют особый интерес. В конечном счете мы намеревались использовать этот метод для исследования роли самых разнообразных условий. Условием, выбранным для первых опытов, была температура, и результат, подтвержденный впоследствии работами автора, свидетельствовал о том, что с увеличением температуры в нормальных для организма пределах частота мутаций увеличивалась так, как если бы мутация в основном представляла собой обычную химическую реакцию.

МУТАЦИИ КАК ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

В соответствии с этой точкой зрения единичная мутация соответствует индивидуальному молекулярному изменению: растянувшаяся же на тысячи лет серия мутаций в громадном числе идентичных генов популяции соответствует течению обычной химической реакции, происходящей среди громадного числа молекул, заключенных в лабораторную пробирку, и протекающей в течение долей секунд. Разница в скорости связана с тем, что индивидуальный ген в своем биологическом окружении гораздо стабильнее обычной химической молекулы при воздействии на нее различных реагентов. Таким образом, мутации, взятые в целом, должны подчиняться статистическим законам, приложимым к массовым реакциям, тогда как индивидуальная мутация соответствует изменению одной молекулы и должна подвергаться случайностям ультрамикроскопических или атомных событий. Появление же мутантной особи является грандиозным усилением этого явления. Этот принцип дает ключ к пониманию того факта, который иначе находится в противоречии с рациональной, научной, макроскопически детерминистской точкой зрения, согласно которой различия во внешних условиях или в состоянии живого существа не влияют, по-видимому, на возникновение мутаций, и наоборот, в нормальных и постоянных внешних условиях возникают мутации разного типа. Этот принцип согласуется также с тем фактом, обнаруженным нами примерно в то же время, что при возникновении мутации в данном гене другой идентичный ген, находящийся в той же клетке, обычно не изменяется, хотя он, конечно, находится в тех же самых макроскопических физико-химических условиях, что и мутировавший ген. По этой концепции мутации обычно возникают в результате субмикроскопических случайных событий, т. е. в результате «капризов» теплового движения, происходящего на молекулярном и субмолекулярном уровнях. Впоследствии Дельбрюк и Тимофеев-Ресовский в более подробной работе о влиянии температуры показали, что увеличение частоты мутаций с повышением температуры происходит быстрее,

чем это происходило бы в случае обычной химической реакции в пробирке, причем в соответствии с тем, чего следовало ожидать для реакции с такой низкой абсолютной скоростью (т. е. с малой долей молекулярных изменений в единицу времени), которая вытекает из наблюдаемой частоты мутаций. Это количественное совпадение помогает подтвердить правильность всей концепции в целом.

Далее, вывод о немакроскопической природе индивидуальной мутации, столь отличающей ее от остальных макроскопически обнаружимых химических изменений, естественно привел к предположению, что некоторые «точечные эффекты», вызываемые излучениями высокой энергии типа рентгеновых лучей, могут вызвать также и изменения в генетическом материале. Поскольку мутацию вызывает даже такое относительно мягкое воздействие, как тепловое возбуждение, очевидно, что энергетически гораздо более сильное возбуждение, вызванное радиацией, также должно вызывать мутации. И действительно, наши исследования по применению рентгеновых лучей, проведенные с помощью таких же генетических методов, как и ранее поставленные исследования о роли температуры, показали, что радиация гораздо эффективнее простого увеличения температуры, поскольку за полчаса облучения в обработанных клетках можно получить раз в 100 больше мутаций, чем их возникнет спонтанно за целое поколение. Было обнаружено, что эти мутации также обычно возникают локально и случайно в единичном гене, не затрагивая в то же время идентичного гена, который может присутствовать поблизости в гомологичной хромосоме.

РАДИАЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ

Кроме изменения индивидуальных генов радиация вызывает перегруппировки частей хромосом. Как показали наши последующие работы (в частности, с сотрудниками, особенно с Райхаудхьюри и Понтекорво), эти изменения возникают в первую очередь в результате разрывов хромосом, за которыми следует присоединение разорванных концов друг к другу, в результате чего они соединяются не в том порядке, как ранее. Два или несколько разрывов, участвующих в такой перестройке, могут располагаться далеко друг от друга и быть вызваны разными ударами и таким образом приводят к тому, что мы называем *крупными* структурными изменениями. Эти изменения бывают разного типа в зависимости от того, где именно произошли разрывы и какие именно образовавшиеся концы соединились друг с другом. Несмотря на то, что индивидуальные концы соединились друг с другом. Несмотря на то, что индивидуальные «удары» обладают в общем весьма локальным действием, не так уж редко в близлежащих точках происходят два разрыва, что равносильно одному локальному изменению (или по крайней мере одной локальной группе изменений), влияние которого распространяется на определенное расстояние в обе стороны. Воссоединение в новом порядке разорванных концов, возникших в результате таких соседних разрывов, приводит к *мелким* изменениям последовательности генов. Как правило, маленькие участки, расположенные между двумя разрывами, теряются («пехватка»), но иногда они меняют ориентацию («инверсия») или даже попадают в совершенно другую область хромосомы, ставшую доступной в результате образования в ней независимого разрыва.

И ранние и последующие работы с сотрудниками (Оливер, Хансон и др.) четко показали, что частота генных мутаций прямо пропорциональна дозе облучения, независима от длины волны, от вида облучения, будь то рентгеновы, γ - или даже β -лучи, и от времени облучения. С тех пор эти факты были подтверждены с большой точностью, особенно в работах Тимофеева-Ресовского с сотрудниками. В нашей сравнительно недавней работе с Райхаудхьюри эти принципы были распространены для γ -лучей на столь малые дозы, как 400 рентген и столь малую интенсивность облу-

чения, как 0,01 рентген в минуту. Эти данные, как мы думаем, неизбежно приводят к заключению, что пороговой дозы не существует и что индивидуальная мутация происходит в результате индивидуального «удара», вызывающего генетический эффект в непосредственной близости от него. Пока не решено, являются ли эти так называемые «удары» отдельными ионизациями или возбуждениями на более низких энергетических уровнях или напротив для них требуется скопление ионизаций, которые встречаются на концах электронных треков и на их боковых ветвях (на эту возможность указали Ли и Фано). Но в любом случае они являются даже при микроскопическом рассмотрении тем, что мы называем «точечными мутациями», поскольку при них происходят изменения лишь на ультрамикроскопическом уровне. Возникновение или невозникновение этих мутаций в определенной точке является вероятностным процессом, причем этот термин употребляется в том же значении, что и в математической статистике.

Естественно, что вызывать мутации могут не только фотоны, но и другие агенты, способные давать аналогичные эффекты, что было показано сотрудниками Альтенбурга в Хаустоне для нейтронов (Нагаи и Лохер) и для α -лучей (Уард) и подтверждено Тимофеевым-Ресовским и его сотрудниками (Циммером и др.). Более того, как показал Альтенбург, на гены оказывают влияние даже еще меньшие квантовые изменения, вызванные ультрафиолетовыми лучами. Однако они вызывают относительно малое число перестроек участков хромосомы (Меллер и Маккензи) и даже проявляют тенденцию к подавлению таких перестроек, как было показано Свенсоном, а затем Кауфманом и Холлендером. Поскольку эффективные удары ультрафиолета представляют собой скорее всего случайным образом разбросанные изменения отдельных атомов в пуринах и пиримидинах, входящих в состав хромосом, а не изменения в группе атомов, кажется вероятным, что во всяком случае для возникновения генных мутаций не нужны скопления ионизаций. Однако мы не можем быть уверенными в этом до тех пор, пока не будет лучше известна связь между частотой мутаций и дозой ультрафиолетовых лучей.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ И СПОНТАННЫЕ МУТАЦИИ

Ввиду того, что изменения генов, вызванные радиацией, наверняка имеют случайную природу, не предумышленны и не телеологичны в отношении ценности конечного результата для организма и его потомков, интересно сравнить их с так называемыми спонтанными, естественными мутациями. Действительно, радиационные мутации дают нам критерий того, какими должны быть на самом деле случайные изменения. Сейчас показано, что у дрозофилы мутации генов, индуцированные излучением (мы исключаем здесь обнаружимые хромосомные перестройки), во всех отношениях, по которым было проведено сравнение, походят на мутации, возникающие естественным путем в лаборатории или в природе. Они обычно происходят в одном гене, не затрагивая идентичного аллельного гена, расположенного поблизости. Они примерно также распределяются по хромосомам. Их эффект может быть как значительным, так и малым и у них наблюдается примерно такое же соотношение числа полностью летальных и так называемых видимых генных мутаций. Таким образом, нет данных о том, что мутации, индуцированные радиацией, более вредны. Если мы обратим свое внимание на конкретные гены, то обнаруживается, что в обоих случаях может возникнуть полная серия разных форм или аллелей этих генов, сходных, а во многих случаях практически идентичных друг другу. Действительно, если достаточно долго искать, под действием радиации можно получить точно такую же мутацию, что и любая естественная мутация. Более того, при всех проверенных условиях жизни организма

эффект оказывается случайным как при облучении, так и без него, в последнем случае он обнаруживается, правда, с гораздо меньшей частотой. Не означает ли все это однозначным образом, что естественным мутациям действительно не свойственно давать именно адаптивные формы или даже различаться в целом в зависимости от естественных условий? Иными словами, мутацию нельзя описать как макроскопическое событие. Мутации должны возникать в результате ультрамикроскопических случайных событий молекулярного и субмолекулярного движения, т. е. индивидуальных квантовых переходов, вызванных тепловым возбуждением, если использовать этот термин в широком смысле. Чтобы отвергнуть этот вывод, остается единственная лазейка, а именно предположение, что спонтанные мутации вызываются естественной радиацией, источником которой являются радиоактивные вещества и космические лучи, но простой расчет (Мотт-Смита и автора в сотрудничестве с другими) показывает, что интенсивность этой радиации совершенно недостаточна для того, чтобы объяснить большую часть мутаций, возникающих у большинства организмов.

Но утверждение, что большинство естественных мутаций является результатом квантовых переходов, вызванных тепловым движением, и что, кроме того, для возникновения мутации необходимо достигнуть определенного энергетического уровня, не означает, как это, по-видимому, подразумевают некоторые авторы, что никакие физико-химические условия внутри и вне организма, кроме температуры, не оказывают влияния на частоту их возникновения. То, что такие обстоятельства могут играть заметную роль, было очевидно с самого начала, когда при исследовании спонтанной частоты мутаций было обнаружено (в 1921 г., опубликовано в 1928 г.), что в одной генетической линии частота мутаций раз в 10 больше, чем в другой. Позднее мы обнаружили, что на разных стадиях жизненного цикла одного и того же организма частота мутаций может сильно отличаться. И наконец работа Ауэрбах и Робсона показала, что горчичный газ и родственные вещества могут вызывать мутации с такой же высокой частотой, как и большие дозы рентгеновых лучей. Однако во всех этих случаях эффект также подвержен случайным колебаниям; каждое индивидуальное событие неконтролируемо и неадаптивно.

Следует еще отметить в связи с этим, что не при всех условиях гены одинаково подвержены мутационному действию даже рентгеновых лучей. Например, гены спирализованных хромосом спермиев изменяются легче, находясь в более обычном состоянии «покоя». Мы уже упоминали о том, что ультрафиолетовые лучи, как показал Свенсон, кроме собственного мутационного действия, подавляют процесс разрывов хромосом или во всяком случае процесс воссоединения разорванных участков в новом, жизнеспособном порядке. В недавних же опытах Холлендера и Кауфмана было показано, что инфракрасные лучи обладают противоположным действием. Стадлер в своей замечательной работе по возникновению мутаций у злаков, начатой независимо от нас, получил данные, что на этом объекте рентгеновы лучи в применяемых дозах не вызывают заметного увеличения частоты генных мутаций, но индуцируют значительное количество разрывов хромосом, приводящих и к крупным и к мелким перестройкам участков хромосом. Либо у этого объекта гены более стабильны к действию рентгеновых лучей, чем к тепловому возбуждению, либо одновременно с генным изменением рентгеновы лучи вызывают разрыв или потерю. С другой стороны, генные мутации, подобные тем, которые спонтанно возникают у этих растений, вызываются более мягкими квантами ультрафиолетового излучения.

Мне кажется, что мы должны были ожидать таких вариаций эффективности. Они не затрагивают вывода о случайной, квантовой природе события, которое обычно является началом генной мутации. Существование

этих вариаций позволяет надеяться, что дальнейшее их изучение поможет лучше понять природу мутационного процесса, а также генетического материала, подверженного изменению.

КОНТРОЛИРУЕМЫЕ МУТАЦИИ?

Никто сейчас не может ответить на вопрос, можно ли найти такие специальные воздействия, подобные, например, специфическим антителам, которые могут вызвать изменение индивидуальных генов. Очевидно, следует продолжать поиски таких воздействий, а также способов увеличения контроля над микроскопическими и субмикроскопическими событиями. Однако пока нет никаких достоверных данных о том, чтобы нечто в этом духе было сделано искусственно или происходило естественно. Очевидно, что нельзя выработать единого метода контроля состояния гена, если он вообще возможен, без более глубокого, чем сейчас, знания тонкой химической структуры и функций самых сложных и разнообразных из существующих веществ, а именно нуклеопротеидов, белков вообще и ферментов в частности. Работы Самнера, Нортропа и Стэнли и других химиков, изучающих белки, дают указания в этом направлении, однако все согласится, что здесь начинается длинная и запутанная система дорог.

Правда, известны некоторые случаи, когда определенные мутабилизные гены изменяются в ответ на соответствующие условия. Такие случаи могут помочь пролить свет на структуру гена, но пока у нас нет никаких указаний, что изменения этих генов, которые в большинстве известных случаев являются ненормальными генами, имеют что-то общее с обычными естественными мутациями. Известно также, что у бактерий и у вирусов можно иногда индуцировать определенные типы наследственных изменений под воздействием определенных веществ, но в этих случаях всегда оказывается, что действующие вещества и вещества, наличие которых затем индуцируется, оказываются идентичными, так что можно подозревать, что они на самом деле определенным образом внедрились в клетки, и поэтому здесь мы не имеем дела с истинными специфическими индуцированными мутациями.

До сих пор у нас нет ни способов, ни перспектив индукции по желанию определенных мутаций в обычных организмах. Однако в качестве первого шага в этом направлении, если оно вообще возможно, можно рассматривать получение большого количества случайных мутаций. Пока мы не можем направлять процесс мутации, громадную роль играет селекция, и прогрессивное изменение наследственных свойств живого организма можно осуществить лишь путем максимально радикальной селекции возникающих мутаций, поскольку подавляющее большинство из них, не являясь адаптивными, обладает вредными свойствами. Для заметного прогресса обычно необходимо накопление значительного числа редких шагов в этом трудном селективном процессе. Большинство из них является индивидуальными маленькими шагами, но, как показали межвидовые и межродовые скрещивания, возможен ряд больших резких шагов, которые, по терминологии Хаксли, были «забуферены» небольшими изменениями, приготовившими организм к ним. Это накопление многих редких, как правило, незначительных изменений, является не только основным способом искусственного усовершенствования животных и растений, но даже в большей степени характерно для протекания естественной эволюции под влиянием естественного отбора. Таким образом теория Дарвина получает твердую основу и освобождается от представлений ламаркизма о направленной изменчивости, которые некогда обременяли ее.

Вероятно, что в природном состоянии у большинства видов частота мутаций не намного ниже (хотя и ниже), чем это для них было бы наиболее выгодно, принимая во внимание степень строгости естественного отбора

уданного вида. Гораздо бóльшая частота мутаций привела бы, по-видимому, к такой большой скорости генетических дегенеративных процессов, что естественный отбор не смог бы им противодействовать. Но в условиях искусственного разведения, когда селекция может быть более эффективной, повышенная частота мутаций в некоторых случаях допустима. Кроме того, в искусственных условиях можно выращивать организмы с большими мутациями, до тех пор пока они не окажутся соответствующим образом забуферены. При этом можно получить практические результаты, применяя рентгеновые или ультрафиолетовые лучи, а также другие воздействия, что наиболее ярко показал Густафссон для рентгеновых лучей. Это особенно справедливо для видов, у которых и в природных условиях имеет место интенсивный инбридинг, или ярко выраженная гаплоидная фаза, или гаплоидна значительная часть генома, поскольку при таких условиях многие спонтанные мутации, которые в противном случае могли бы накапливаться в популяции, а затем выявиться при инбридинге, отсеваются до того, как их можно обнаружить. В результате этого естественная частота мутаций оказывается ниже.

До сих пор мы в основном рассматривали связь между возникновением генных мутаций и проблемой общего характера эволюции, в частности природой наследственных изменений. Исторически это был основной путь, по которому развивались подходы к искусственному получению мутаций. Однако с самого начала было очевидно, что, как мы уже однажды говорили, индукция мутаций может дать нам в руки чрезвычайно тонкие методы для последовательного анализа физиологического, эмбриологического и биохимического строения и функционирования живых существ. Работы с использованием спонтанных мутаций, такие, как, например, Бонневи, Грюнберга, Скотт-Монкрифа, Эфрусси и Бидла, уже сейчас показали, как много можно узнать о сложных процессах, посредством которых гены приводят к образованию организма, если внимательно проследить эффекты и взаимодействие эффектов всего одной или нескольких мутаций. Но генов тысячи, и было бы желательно выбирать их для исследования в определенном порядке, по мере того, как мы продвигаемся в нашем процессе анализа. По этим причинам мы считали, что будет часто выгодно искусственно получать мутации в больших количествах, чтобы затем иметь выбор и брать те гены, которые лучше подходят для последовательных этапов нашего анализа. Недавняя работа Бидла и сотрудников на нейростере и последовавшая затем аналогичная работа Мелина и Фрайса ярко показала приложимость этого метода для изучения путей биохимического синтеза аминокислот, витаминов, пуринов, пиримидинов и пр. И все же в известном смысле вся эта область в целом пока лишь слегка затронута и мы можем с уверенностью ожидать, что сочетание этого метода с методом меченых атомов и со всеми другими методами биохимии, физиологии и экспериментальной эмбриологии будет способствовать распутыванию того чрезвычайно сложного клубка процессов, из которых состоит живое существо. Однако у нас нет времени далее углубляться в этот предмет.

ХРОМОСОМНЫЙ АНАЛИЗ

Мы не можем избежать здесь краткого изложения другой стороны работы по искусственным мутациям, которая особенно интересна генетикам, а именно дальнейшего анализа свойств хромосом и их частей, проведенного главным образом в исследованиях, где эти части удалялись, добавлялись или перегруппировывались. Мы уже мимоходом отмечали, что при исследовании механизма таких структурных изменений сложилась сравнительно простая общая схема механизма их образования: сначала возникают разрывы хромосомы, а затем происходит соединение разорванных концов. Было с самого начала очевидно, что с помощью таких пере-

строек хромосом можно получить дополнительные доказательства физической реальности карт сцепления. Это и было проделано (Меллер и Пайнтер). Далее оказалось возможным пролить некоторый свет на проблему кроссинговера, показав, например (Меллер, Стои и Офферманн), что в какое бы место хромосомы не была перенесена центромера, она оказывает сильное подавляющее действие на кроссинговер, причем степень этого подавления постепенно уменьшается с расстоянием от нее. Более того, это оказалось справедливым для любой точки, в которой нарушается непрерывность спаривания хромосом за счет гетерозиготности по структурному изменению. Такие исследования кроссинговера и сил конъюгации, влияющих на расщепление, могут быть еще успешно расширены.

Мы должны помнить, говоря о центромере и других явно выделенных участках хромосомы, что до тех пор, пока не изучено влияние удаления или перемещения этих участков, у нас нет никакого права считать их автономными локально определенными структурами, зависящими только от тех генов, которые находятся в области этих структур. Поэтому для того, чтобы сделать вывод, что центромера в большинстве случаев является такой автономной органеллой, зависящей только от гена или генов, находящихся в непосредственной близости от нее (но не во всех случаях в непосредственной близости, как недавно показал Родс для определенной линии кукурузы), понадобились исследования индуцированных инверсий, делеций и транслокаций хромосом. Аналогично удалось показать (несмотря на ряд утверждений противоположного характера, справедливость которых мы не можем здесь обсуждать), что свободный конец хромосомы или теломера образует у многих объектов локально детерминированную специфическую структуру.

При сочетании генетического и цитологического анализа различных разрывов и перестроек было обнаружено, что в хромосоме имеются четкие локально детерминированные области, обычно наиболее развитые около центромеры. Первоначально их называли «инертными», а сейчас обычно называют «гетерохроматиновыми» областями. Эти области были также независимо обнаружены в чисто цитологических исследованиях Хейтса. Было бы очень заманчиво обсудить здесь те замечательные особенности, которые выявились при цитогенетическом изучении этих областей (данные о повторении более или менее одинаковых частей, о стремлении участков, расположенных в разных местах, конъюгировать друг с другом, о четких цитологических различиях, в случае наличия или отсутствия такой конъюгации, о чрезвычайно высокой тенденции к структурным изменениям, о сильном влиянии некоторых генов, находящихся в этих областях, на расщепление и так далее), а затем перейти к обсуждению гипотез об эволюционном происхождении и функциях гетерохроматина. К сожалению, это увело бы нас слишком в сторону от темы. Однако мы должны указать на одно обстоятельство, пока еще не осознанное большинством исследователей. Существуют очень веские данные, что участки хромосом, известные под названием «гетерохроматина», в том виде, как они выявляются на стадии митоза у дрозофилы, являются просто большими непостоянными образованиями, состоящими из вспомогательного негенетического нуклеопротеида, образованного под влиянием одного или двух определенных генов из той дюжины или несколько большего числа генов, составляющих всю гетерохроматиновую область. Это доказывается генетическим анализом и видом хромосом в стадии покоя (например, в слюнных железах). И не эти бросающиеся в глаза негенетические блоки ответственны за остальные известные особенности гетерохроматина; функции же этих блоков пока не известны. Иными словами, так называемый «гетерохроматин», с которым имеют дело цитологи при изучении митотических хромосом, является совсем не тем, хотя и находится рядом с тем истинным гетерохроматином, который обладает вышеперечисленным набором

свойств. Более того, удалось показать (Сеттон-Герш в сотрудничестве с автором, не опубликовано), что четко выраженные ядрышки, часто связанные с гетерохроматином, образуются под влиянием других автономных генов, расположенных в нем, но не тех, которые ответственны за блоки, видимые в митозе.

Одним из самых интересных открытий, сделанных при изучении хромосом дрозофилы, осуществивших перестройку в результате облучения, было выяснение универсальности явления, известного как «эффект положения». Этот эффект был впервые обнаружен Стертевантом для случая спонтанного мутанта, известного под названием *полосковидные глаза* (Bar), однако до тех пор, пока нельзя было изучить большое количество перестроек, оставалось неясным, насколько общим является этот феномен. Термин «эффект положения» подразумевает, что работа гена в определенной степени зависит от других генов, лежащих по соседству с ним. Теперь имеются достоверные данные, что эффект положения представляет собой общее явление, распространяющееся на очень многие, если не все гены дрозофилы, и что их работу можно как качественно, так и количественно контролировать характером соседних генов. Некоторые гены при этом дают гораздо больший эффект, чем другие, и разные гены действуют в разных направлениях и в разной степени.

Возможно, что эффект положения обусловлен, как предположил Стертевант, взаимодействием генных продуктов в непосредственной близости от генов, их образующих. Для этого надо допустить, что эти продукты находятся там в большей концентрации и в таких условиях сильнее взаимодействуют друг с другом, чем в разведенном состоянии. Однако мы предпочитаем другое объяснение, по которому действие гена зависит от его формы и она в свою очередь изменяется от силы и природы сил синапсиса, действующих на область хромосомы, в которой находится этот ген. Эти силы могут слагаться из сил, действующих на ген со стороны других как аллельных, так и не аллельных генов (Меллер). Эти силы могут зависеть от уровня спирализации участка хромосомы и от других причин, которые в свою очередь частично зависят от сил синапсиса (Эфрусс и Сеттон). Эта гипотеза в любом варианте может объяснить, почему эффект положения гораздо больше распространен у дрозофилы, относительно которой известно, что сила синапсиса в значительной мере проявляется и в митотических клетках, по сравнению с другими изученными организмами, у которых эти силы либо гораздо слабее, либо вообще отсутствуют в соматических клетках. Это объяснение также согласуется с тем, что, как обнаружил автор, в гетерохроматиновых областях имеется тенденция к образованию особенно сильного и выраженного эффекта положения, причем эффект изменяется в зависимости от полного количества гетерохроматина, присутствующего в клетке, а также от колебания ряда факторов, действующих в эмбриогенезе. Эти генетические наблюдения согласуются с цитологическим проявлением обнаруженного впервые Прокофьевой влияния гетерохроматина на растяжение, поведение при синапсисе и другие свойства находящегося по соседству хроматина. Прокофьева показала, что эти эффекты подвержены сходным колебаниям, которые коррелируют с вариациями в фенотипически наблюдаемом эффекте положения. Недавние наблюдения Эфрусса и Сеттона, сделанные вслед за предположениями автора и Штерна, также, по-видимому, указывают на то же, поскольку они позволили обнаружить зависимость проявления эффекта положения в определенном участке хромосомы от расположения участков в гомологичной хромосоме. Если это объяснение, основанное на роли формы гена, окажется правильным, откроется возможность по-новому подойти к выяснению структуры и характера действия генов, при этом возможно удастся показать тесную связь этих свойств с нуклеопротеидным составом и свойствами гена.

Другое применение процесса разрыва и перестроек хромосом, вызванных радиацией, заключалось в изучении влияния добавления или утери небольших участков хромосом для выяснения связи между дозой гена и его выражением. Таким способом было обнаружено, что, во-первых, большинство обычных генов даже в единичной дозе почти полностью выражены, и, во-вторых, большинство мутантных генов дают, в конце концов, эффект, качественно сходный, но количественно менее выраженный, чем эффект их нормального аллеля. Доминирование нормального гена над своими мутантными аллелями при этом оказывается, как правило, частным случаем принципа, по которому одна доза нормального гена обычно дает почти такой же, хотя и несколько меньший эффект, что и две дозы. Это, в свою очередь, лучше всего объясняется допущением, что такие свойства возникли в результате длительного процесса отбора нормального гена и генов, влияющих на него, в сторону обеспечения стабильности выражения при действии факторов внешней среды и генетического окружения. Эти факторы могут количественно повлиять на действие гена, т. е. их действие аналогично изменению дозы. Это, однако, не значит, что отбор действовал исключительно в сторону создания доминантности нормального гена над своими аллелями, во-первых, потому, что не все мутантные гены ведут себя просто как ослабленные нормальные гены, и, во-вторых, потому, что те аллели, для которых проверка влияния дозы выявляет качественно новые эффекты по сравнению с нормальным геном, часто являются исключением из правила и не подвержены доминирующему действию своего нормального гена, что и следовало ожидать по нашей гипотезе.

Среди других результатов исследований дозы генов, проведенных с использованием фрагментов хромосом, возникших под действием радиации, следует обратить особое внимание на наблюдения, объединяемые под названием «дозовая компенсация». Было показано, что 1) при постоянной дозе практически всех генов X-хромосомы, за исключением какого-либо одного гена, его выражение столь мало отличается в случае единичной и двойной дозы, что по соответствующему признаку обычно практически невозможно обнаружить никаких различий, однако 2) это невидимое различие оказалось столь важным для организма, что в процессе естественного отбора выработалась система модифицирующих генов, которые называются компенсаторами. Функция компенсаторов состоит в том, что они вызывают еще меньшую разницу в эффекте единичной и двойной дозы генов, которые в норме имеются у соответствующих полов, когда эти различия в дозе определенного гена одновременно сопровождаются различиями по остальным генам X-хромосомы. По-видимому, у каждого гена выработалась своя система компенсаторов, причем их взаимодействие между собой очень сложно. Это позволяет посмотреть еще под одним углом зрения на «дотошность» естественного отбора, на чрезвычайно точную адаптивность признаков и на окончательный характер признаков, который обычно устанавливается в результате накопления многочисленных малых мутаций, связанных между собой чрезвычайно сложным функциональным взаимодействием. Это согласуется с утверждением, сделанным ранее, что эволюция идет за счет отбора многочисленных мелких случайных изменений.

Если сконцентрировать внимание на определенной четко ограниченной области хромосомы, то при сравнении разных индуцированных перестроек, которые все имеют точку разрыва в этой области, выявляется еще один факт, касающийся делимости хромосомы и генов. С помощью специальных генетических методов, в детали которых мы не можем здесь вдаваться, были получены данные, что разрывы в таких ограниченных участках имеют тенденцию возникать в специфических точках. Это указывает на то, что между этими точками лежат дискретные единицы или сегменты,

и является доводом против предположения, по которому хромосома представляет собой однородную непрерывную структуру. Это свидетельствует, что гены соответствуют физически реальным структурам и не являются просто удобными понятиями, произвольно выбранными генетиками. Таким способом оказалось возможным, кроме того, примерно оценить количество генов в хромосоме, а также их максимальные размеры. Эти оценки согласуются настолько близко, насколько этого вообще можно было ожидать, с теми оценками, которые были получены в предыдущих генетических работах с использованием совершенно других методов, хотя и не согласуются с оценками, основанными на гипотезе «чувствительного» объема.

ДУПЛИКАЦИИ И ЭВОЛЮЦИЯ

Другое наблюдение, сделанное при изучении перемещений небольших фрагментов в другое место хромосомы, вызванных облучением, заключается в том, что даже в том случае, когда у какой-либо особи определенный участок имеется и в исходном и в новом месте хромосомы, она часто оказывается жизнеспособной и дает потомство. Именно в работах такого типа был изучен эффект добавочных доз гена. В некоторых случаях можно даже получить линии, гомозиготные как по новому, так и по старому участку. Это приводит к мысли, что именно так в процессе эволюции происходит удвоение хромосомного материала. Когда при анализе ограниченной области X-хромосомы, в которой находится локус так называемого «scute» эффекта, было обнаружено, что в действительности в нормальной X-хромосоме имеется два очень близко расположенных гена, дающие близко связанные эффекты («achaete» и «scute»), стало очевидным, что это является, по всей вероятности, примером постулированного выше явления. Здесь таким образом мы видим, по-видимому, основной, если не единственный способ (если исключить гораздо более редкие явления полиплоидии и «тетрасомии»), с помощью которого в процессе эволюции увеличилось число генов. По забавному совпадению как раз в это время Бриджес занимался изучением хромосом слюнных желез и нашел прямые цитологические доказательства существования в нормальной хромосоме таких, как он их назвал, «повторений» и дал им аналогичную интерпретацию. За 12 лет, прошедших после этого, было обнаружено несколько других четких примеров такого же типа. Таким образом, увеличение числа генов, вызванное дупликациями небольших участков хромосомы, чаще всего рядом с исходным участком, необходимо рассматривать как один из основных процессов в эволюции, наряду с мутациями индивидуальных генов. Сам по себе этот процесс не играл бы существенной роли, но он приобретает большое значение, поскольку после дупликации возможны дальнейшие мутации, в результате чего первоначально идентичные гены в разных положениях начинают отличаться друг от друга. Вследствие этого увеличивается число разных генов и зародышевые клетки, а вместе с ними процесс эмбрионального развития и весь организм в целом могут стать более сложными.

В эволюции могут, конечно, происходить и такие перестройки хромосомы, которые не приводят к увеличению числа генов, но мало вероятно чтобы они играли столь же важную роль. Но, вызывая такие изменения в лабораторных условиях, удалось многое узнать о том, какие бывают перестройки и каковы их свойства. При этом можно сделать ряд выводов о жизнеспособности и плодовитости разных типов перестроек при различных генетических условиях и о том, будут ли они обладать тенденцией к отсеvu или к накоплению в популяции данного типа. Можно показать, что некоторые из них при определенных условиях могут иметь эволюционную ценность в отношении выживаемости либо способствуя процессу

генетической изоляции либо как-либо иначе, например, влияя на гетерозис. Таким образом, можно было сделать ряд выводов, имеющих эволюционное значение, и которые были затем подтверждены сравнением хромосомных различий, существующих в действительности у разных близких родов, подвидов и видов.

Вероятно, еще больший интерес будут представлять результаты изучения мутаций, происходящих в индивидуальных локусах. Мутации, индуцированные радиацией, возникают достаточно часто для того, чтобы их можно было использовать для изучения возможностей разных локусов, однако в этом направлении сделано пока очень мало. Аналогично, сравнение разных мутаций, возникающих в одном и том же локусе, может привести к очень важным результатам, особенно если учесть, что у разных аллелей, как было показано, возможны очень сложные взаимоотношения друг с другом, вплоть до того, что при скрещивании они могут приводить к восстановлению нормального типа. Вопрос о том, как может меняться ген в процессе последовательных мутаций, остается открытым. То же следует сказать о том, как меняется мутабельность гена в результате возникновения мутации в нем самом.

СОМАТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ РАДИАЦИИ

Чем дальше продвигалось изучение генетических последствий облучения, особенно разрывов и перестроек хромосом, тем больше укреплялось убеждение в том, что большая, если не основная часть соматических эффектов облучения, наблюдаемых врачами и исследователями в области эмбриологии, регенерации и общей биологии, являются вторичными по отношению к генетическим эффектам, возникшим в соматических клетках. Продуктивность такого подхода была недавно продемонстрирована в исследованиях Коллера, пользовавшегося усовершенствованными методами облучения раковых опухолей у млекопитающих. Это слишком обширная область, чтобы подробно обсуждать ее здесь, однако следует отметить, что анализ основывался в первую очередь на генетическом и цитологическом исследовании размножающихся клеток и их потомства. Здесь, таким образом, открывается возможность понимания механизмов, посредством которых радиация вызывает подавление роста, стерильность, некрозы, удаляет злокачественные опухоли; возможно, здесь приоткроется и путь к вскрытию механизмов возникновения подобных опухолей.

Во время войны появилось неожиданное подтверждение правильности вышеприведенного представления о природе соматических эффектов радиации. Дж. Г. Робсон, работая с горчичным газом в Эдинбурге, был поражен удивительным сходством между соматическими эффектами, вызываемыми этим агентом, рентгеновыми лучами и излучением радия. Поэтому его заинтересовало, не будет ли вызывать горчичный газ в принципе таких же генетических изменений, которые, как известно, вызывает радиация. Вслед за этим Ш. Ауэрбах провела обстоятельные эксперименты, работая совместно с Робсоном, и, как уже вскользь упоминалось ранее, ей удалось действительно показать, что это вещество вызывает мутации как в индивидуальных генах, так и за счет разрывов и перестроек хромосом, причем примерно такие же и примерно в том же количестве, как рентгеновы лучи и излучение радия. Другие вещества той же химической природы оказывали сходное действие. Это является первым бесспорным успехом попыток вызвать мутации химическими веществами. Тот факт, что это открытие было сделано непосредственно на основании вышеприведенных соображений, тогда как до этого столь много попыток вызвать мутации химическими веществами оказались безуспешными, по-видимому, является сильным доводом в пользу того, что все эти специфические соматические эффекты на самом деле являются следствием более глубоко

лежащих эффектов, которые в том случае, когда они происходят в зародышевых клетках, становятся предметом анализа генетиков в их опытах по размножению. Однако существуют некоторые очень интересные различия между характером генетических эффектов облучения и указанных выше химических веществ, обсуждать которые мы не имеем здесь возможности, но которые дают право надеяться, что здесь можно продвинуть и генетический и соматический анализ.

Мы видели, что индукция мутаций под действием облучения является методом, которым можно пользоваться в разнообразных направлениях как для анализа зародышевой плазмы, так и организма, который в известном смысле представляет собой отросток зародышевой плазмы. Можно надеяться, что индукция мутаций в определенных случаях окажется практически полезной человеку при выведении улучшенных пород и сортов животных и растений. Что касается практического применения к самому человеку, то мы пока еще очень далеко отстоим от любого направленного отбора наших зародышевых клеток, хотя, как и большинство других видов, человек уже отягощен бесчисленным количеством нежелательных мутаций, от наличия которых не гарантирован любой индивидуум. Мы можем извлечь, однако, практический урок из понимания того факта, что громадное большинство мутаций не являются полезными. Поэтому необходимо всеми способами избегать их дальнейшего случайного возникновения. Поскольку мы можем смело утверждать на основании опытов с низшими организмами, что все виды излучения высокой энергии должны вызывать такие мутации у человека, радиологи должны — хотя в большинстве стран пока не особенно заметны усилия в этом направлении — настаивать на соблюдении простых предосторожностей по предохранению гонад в тех случаях, когда они подвергаются воздействию таких облучений, будь то в промышленности или в медицинской практике. Кроме того, с увеличением применения атомной энергии, пусть даже в мирных целях, приобретает громадное значение проблема эффективной защиты зародышевой плазмы человека — субстанции первостепенной важности, временными хранителями которой является каждый из нас, — от влияния этого дополнительного и мощного источника постоянного загрязнения окружающей нас среды.

Приложение IV

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

М. ВИЛКИНС

Нобелевская лекция, 1962 г.

Нуклеиновые кислоты в основе своей просты. Они лежат у истока самых фундаментальных биологических процессов роста и наследования. Простота молекулярной структуры нуклеиновой кислоты и ее связь с функцией отражает подспудную простоту биологических явлений и проливает свет на их природу. На ее основе возникла первая широкая трактовка жизненных процессов, базирующаяся на структуре макромолекул. Эти вопросы начали проясняться в результате беспрецедентного сочетания биологических, химических и физических исследований, от генетики до стереохимии водородных связей. Я не буду здесь все это рассматривать, а остановлюсь только на той области, в которой работал сам, и покажу, какой вклад внесло исследование диффракции рентгеновых лучей. Я изложу некоторые основы моих собственных исследований, так как подозреваю, что не я один нахожу, что такие доклады часто интереснее общих обзоров.

ПЕРВЫЕ ПОДСТУПЫ

Я получил ученую степень по физике в Кембридже в 1938 г. за некоторые работы по рентгенокристаллографии. Эти работы были сделаны под влиянием Дж. Д. Бернала, бывшего тогда в Кевендише. Работать я начал в Бирмингеме под руководством Дж. Т. Рендалла, изучая люминесценцию и движение электронов в кристаллах. Те, кто начинал в одно время со мной в Кембридже, интересовались в основном элементарными частицами, но меня больше привлекала структура твердого тела и те особые свойства, которые зависят от этой структуры. Может быть это уже предвещало то, что я заинтересуюсь биологическими макромолекулами и тем, как связаны между собой их структура и в высшей степени специфические свойства, которые в столь значительной степени определяют течение жизненных процессов.

Во время войны я принимал участие в создании атомной бомбы. Когда война окончилась, я, как и многие другие, кидаясь из стороны в сторону в поисках новой области для исследований. Частично из-за бомбы я несколько потерял интерес к физике. Поэтому меня очень заинтересовала книга Шредингера «Что такое жизнь?». На меня произвела большое впечатление концепция о весьма сложной молекулярной структуре, контролирующей жизненные процессы. Этот вопрос представлялся мне более перспективным, чем физика твердого тела. В то время многие ведущие физики, такие, как Мессі, Олифант, Рендалл (а позднее я услышал, что их точку зрения разделяет и Бор), полагали, что физика должна внести существенный вклад в биологию. Их совет придавал мне смелости перейти к занятиям биологией.

Я начал работать в физическом отделе в Сент-Эндрюсе, Шотландия, куда меня пригласил Рендалл с тем, чтобы я участвовал в программах начатых им биофизических исследований. Находясь под впечатлением полученного Меллером изменения наследственного вещества при действии рентгеновского излучения, я подумал, что было бы интересно изучать



РИС. IV-1.

Одна из первых фотографий диффракции рентгеновых лучей на ДНК, полученная в нашей лаборатории. Можно сравнить ее с более поздней фотографией, приведенной на рис. IV—10. (Фотография получена совместно с Р. Гозлингом; ДНК выделил Р. Сигнер)

И. Гершкович

действие ультразвука. Однако результат был не слишком обнадеживающим.

Затем биофизические исследования были перенесены в Королевский колледж, Лондон. Там Рендалл получил Уитстоновскую кафедру физики и создал, с помощью Совета медицинских исследований, необычную для физического факультета лабораторию, где вместе с физиками работали биологи, биохимики и другие ученые. Он предложил мне провести кое-какие исследования количества нуклеиновых кислот в клетках с помощью ультрафиолетового микроскопа. В работе мы следовали за Касперссоном, но использовали ахроматизм отражательного микроскопа. В это время работы Касперссона [1] и Браше [2] открыли научному миру, что нуклеиновые кислоты играют важную биологическую роль, связанную с синтезом белка. Однако тогда существовал только намек на мысль о том, что ДНК сама может быть веществом наследственности. Считалось, что ее функция в хромосоме связана с репликацией белковой нити хромосомы. Еще в 1944 г. была опубликована работа Эйвери, Мак Леода и Маккарти [3], которые показали, что бактерии можно генетически трансформировать посредством ДНК, но даже в 1946 г. о ней как будто почти не знали, или, если знали, то не придавали ей значения.

Хромосомы в клетках под микроскопом представляли завораживающую картину, но я начал чувствовать, что как физик я мог бы дать биологии больше, если бы исследовал макромолекулы, выделенные из клетки. Джералд Остер, пришедший из лаборатории вирусов Стенли, ободрил меня и заинтересовал частицами вируса табачной мозаики. Как показал Касперссон, ультрафиолетовый микроскоп можно использовать не только для определения количества нуклеиновой кислоты в клетках, но и для определения ориентации в молекулах групп, поглощающих ультрафиолетовые лучи. Мы с Биллом Сидсом исследовали ДНК, белки, вирус табачной мозаики, витамин B_{12} и т. п. При изучении под поляризационным микроскопом ориентированных пленок ДНК, приготовленных для исследования ультрафиолетового дихроизма, я увидел крайне однородные нити, дающие явное поглощение между скрещенными николями. Я обнаружил, что эти нити получаютсЯ нечаянно при манипулировании с гелем ДНК. Каждый раз, когда я касался геля стеклянной палочкой и ее поднимал, вытягивалась тонкая, как паутина, почти невидимая нить ДНК. Постоянство и однородность нитей означали, что молекулы в них расположены упорядоченно. Я сейчас же подумал, что эти нити могут быть прекрасным объектом для исследования их с помощью диффракции рентгеновых лучей. И я отнес их Раймонду Гозлингу, единственному из нас, у кого была рентгеновская установка (переделанная из оставшегося после войны рентгеновского аппарата). Он использовал эту установку для получения фотографий диффракции на головках спермиев барана. Руководил этим исследованием Рендалл, который сам работал над диффракцией рентгеновых лучей и прошел школу у В. М. Брегга. Почти сразу же Гозлинг получил внушающие надежду картины диффракции (рис. 1). Этот успех был обусловлен, в частности, тем, что мы держали нити влажными. Мы помнили, что для получения хороших картин диффракции на белках Бернал выдерживал кристаллы белка в маточном растворе. Можно было думать, что конфигурация любых растворимых в воде биологических макромолекул должна зависеть от водного окружения. Мы получили хорошие диффракционные картины с ДНК, выделенной Сингером и Шварцбергом [4]. Эту ДНК Сингер привез в Лондон на заседание Фарадеевского общества, посвященное нуклеиновым кислотам, и великодушно распределил между нами так, чтобы все исследователи могли ее изучить, используя каждый свои методы.

**КАК ПОНЯЛИ, ЧТО ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ ЯВЛЯЕТСЯ
ЧИСТОЕ ХИМИЧЕСКОЕ ВЕЩЕСТВО.
УКАЗАНИЯ НА ИСКЛЮЧИТЕЛЬНУЮ ПРОСТОТУ
ЕГО МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ**

Между 1946 и 1950 гг. накопилось много данных, указывающих на то, что генетическим веществом является ДНК, а не белок или нуклеопротеин. Было открыто, например, что содержание ДНК в наборе хромосом постоянно и что, хотя последовательность нуклеотидов в молекулах ДНК очень сложна, состав ДНК у данного вида тоже постоянен. Было высказано предположение, что генетическая информация содержится в сложной последовательности четырех нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. Теперь все признали огромное значение трансформации бактерий, а открытие Херши и Чейзом [5] того факта, что фаговая ДНК переносит генетическую информацию вируса от родителя к потомству, помогло завершить этот довольно серьезный переворот в мышлении.

Когда стало известно, что генетическим веществом является ДНК, обладающая в высокой степени упорядоченной химической структурой, а не малоупорядоченный нуклеопротеин, надежда на объяснение генетической функции на основе молекулярной структуры значительно возросла. Многие данные указывали на простоту и регулярность структуры ДНК. Химики показали, что ДНК представляет собой полимер, в полинуклеотидной цепи которого регулярно чередуются связанные 3'—5' связями фосфатная группа и дезоксирибоза. Чаргафф [6] открыл важную закономерность: хотя последовательности оснований в полинуклеотидных цепях сложны и состав оснований в разных ДНК сильно различается, в любой ДНК количество аденина равно количеству тимина, а количество гуанина всегда равно количеству цитозина. В электронный микроскоп ДНК была видна как однородная неразветвленная нить с диаметром около 20 Å. Измеряя двойное лучепреломление в потоке, Сингер, Касперссон и Хаммарстен [7] показали, что плоскости оснований в ДНК почти перпендикулярны длине нитевидной молекулы. Проведенные ими измерения ультрафиолетового дихроизма дали тот же результат и показали параллельность расположения оснований ДНК в головках сперматозоидов. Ранее Шмидт [9] и Паттри [9] оптическим методом показали замечательное упорядочение генетического материала в головках спермиев. Первые исследования диффракции рентгеновых лучей на нитях ДНК провел Астбери [10]. Он показал большую упорядоченность ДНК и правильно объяснил сильный рефлекс при 3,4 Å тем, что плоскости оснований уложены в стопку. Проведенное Гулландом и Иорданом [11] исследование методом потенциометрического титрования показало, что основания связаны друг с другом водородными связями, и Гулланд [12] предположил, что полинуклеотидные цепи могут быть связаны этими водородными связями и образовывать таким путем многонитчатые мицеллы.

Таким образом, замечательный вывод о том, что чистое химическое вещество обладает чрезвычайно важной биологической активностью, совпал с углублением разносторонних познаний о природе этого вещества. Тем временем мы начали получать подробные результаты диффракции рентгеновых лучей на ДНК. Лишь данные такого типа могли дать адекватное описание трехмерной конфигурации молекулы.

**НЕОБХОДИМОСТЬ СОЧЕТАТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ
ДИФФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВЫХ ЛУЧЕЙ
НА ДНК С МОЛЕКУЛЯРНЫМ МОДЕЛИРОВАНИЕМ**

Как только были получены хорошие картины диффракции на волокнах ДНК, к ним сразу возник огромный интерес. В нашей лаборатории Алекс Стокс предложил теорию диффракции на спиральной ДНК. Очень ценный

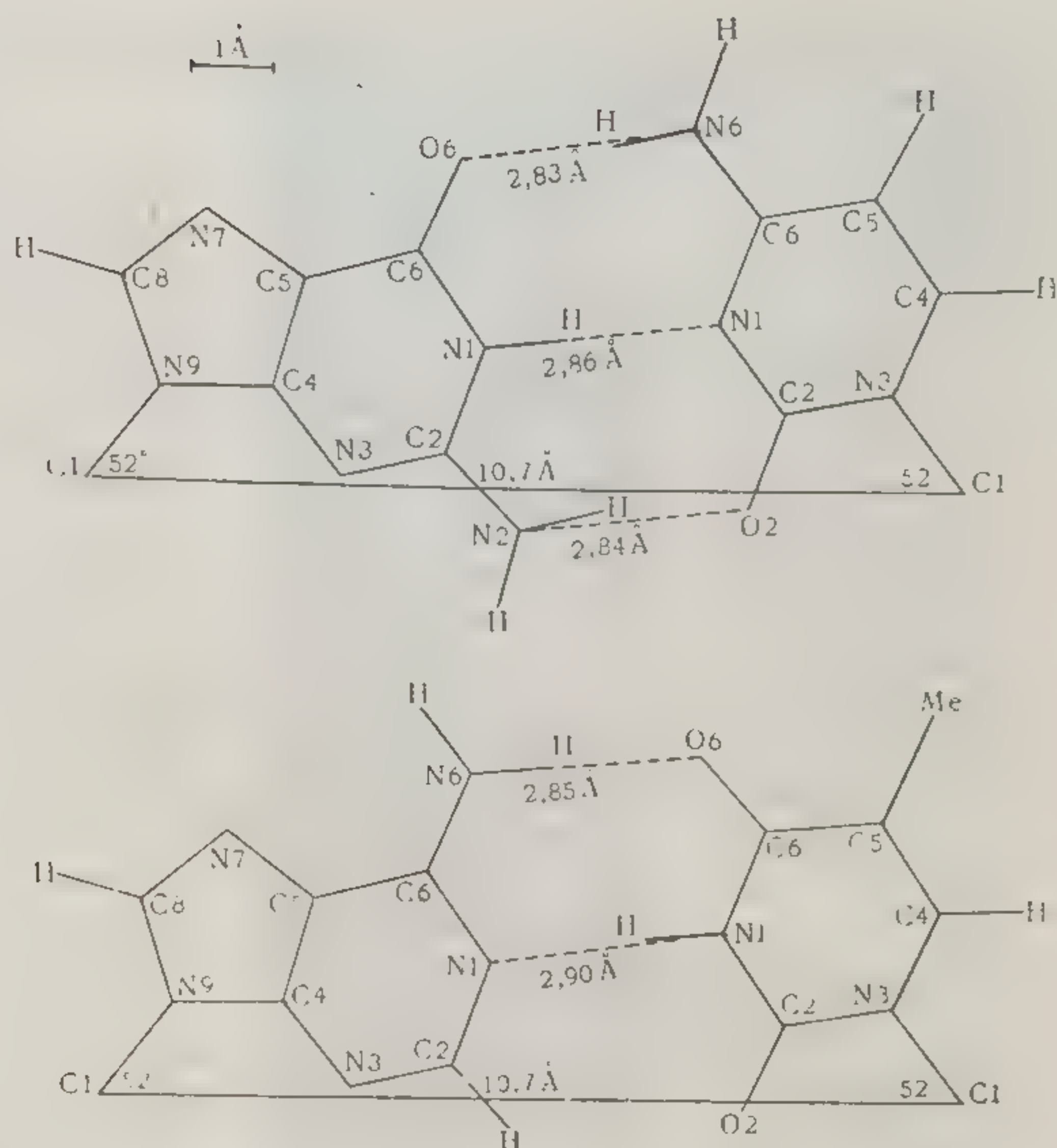


РИС. IV-2.

Пары оснований по Уотсону — Крику (исправлено С. Арноттом).

Вверху: связанные водородными связями гуанин и цитозин. Внизу: связанные водородными связями аденин и тимин. В обеих парах расстояния между концами связей C1 — N9 и C1 — N3 равны 10,7 Å, причем эти связи образуют углы в 52° с линией C1 — C1

вклад в рентгеноструктурный анализ сделала Розалинд Франклин (которая умерла через несколько лет, в зените своей карьеры). В Кембридже, в лаборатории Совета медицинских исследований, где изучали структуру биологических макромолекул, сильно заинтересовались структурой ДНК мои друзья Френсис Крик и Джим Уотсон. Уотсон был биологом, который пришел к Кембриджу, чтобы изучать структуру молекул. Он исследовал репродукцию бактериофага и остро сознавал огромные возможности, которые могли бы открыться после выявления структуры молекул ДНК. Крик изучал структуру спиральных белков и интересовался тем, как осуществляется контроль над синтезом белка. Открыв α -спираль белка, Полинг и Кори показали, что точное построение молекулярных моделей является мощным, вполне правомерным инструментом исследования. Данные рентгеноструктурного анализа ДНК были не так полны, чтобы на их основании, не привлекая стереохимию, можно было получить детальную картину строения ДНК. Ясно было, что для завершения рентгеноструктурного анализа ДНК необходимо построить точную модель молекулы. Мы в нашей лаборатории сосредоточились на получении более полных данных по диффракции, а Уотсон и Крик в Кембридже занялись построением молекулярных моделей.

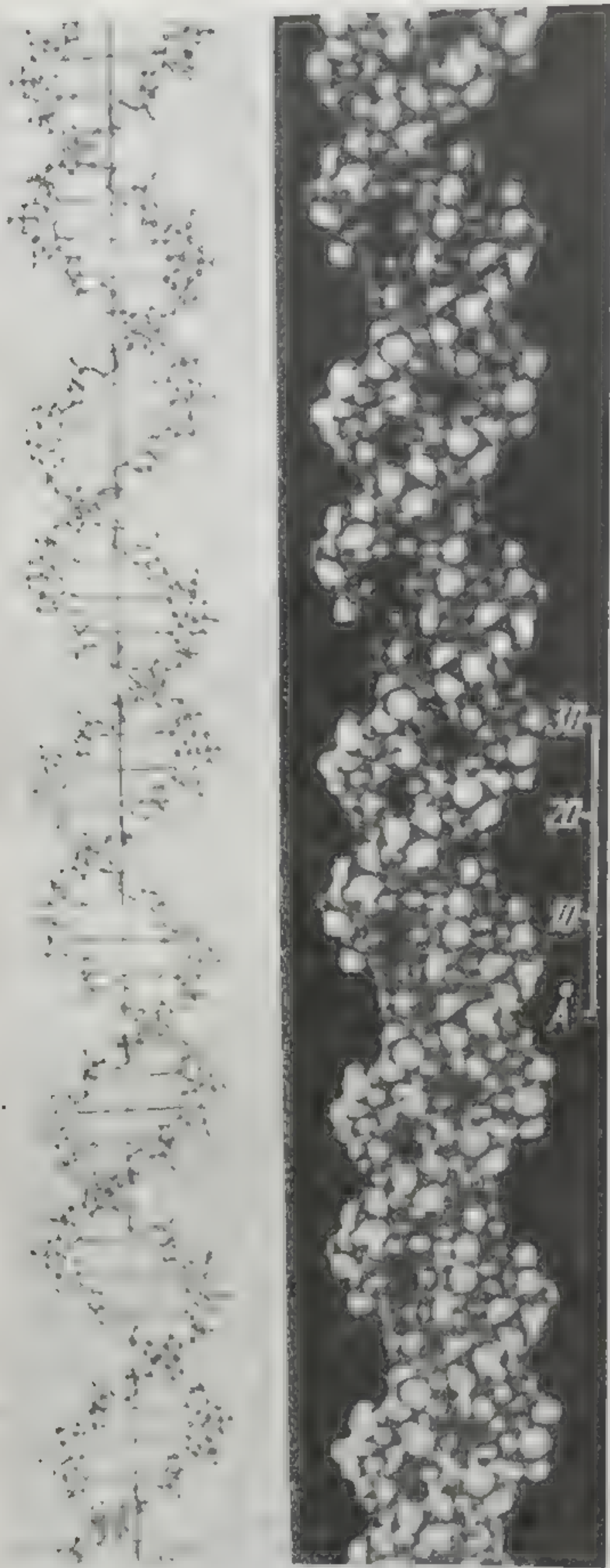


РИС. IV-3.

Справа: молекулярная модель ДНК в конфигурации В. Размеры атомов соответствуют ван-дерваальсовским диаметрам

Слева: схема, соответствующая модели. Ясно видны две полинуклеотидные цепи, которые соединены связанными водородными связями основаниями

шенно одинаковы (с неопределенностью порядка $0,1\text{\AA}$) у обеих пар, и эти связи образуют один и тот же угол (с неопределенностью около 1°) с линией, соединяющей атомы С1 дезоксирибоз (см. рис. 2). В результате, если две полинуклеотидные цепи соединены через пары оснований,

ПАРАДОКС РЕГУЛЯРНОСТИ МОЛЕКУЛЫ ДНК

Четкость дифракционных картин свидетельствовала о том, что молекулы ДНК обладают высокой регулярностью, настолько высокой, что ДНК должна бы кристаллизоваться. Вид картин дифракции ясно показывал, что молекулы спиральны, причем полинуклеотидные цепи в пучке молекул скручены упорядоченным образом. Однако было известно, что вдоль полинуклеотидных цепей расположены в произвольной последовательности пурины и пиримидины разных размеров. Как такое нерегулярное расположение могло привести к высоко упорядоченной структуре? Этот парадокс указал решение проблемы структуры ДНК и был разрешен моделью структуры, предложенной Уотсоном и Криком.

СПИРАЛЬНАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ ДНК

Ключом к структуре молекулы ДНК явилось открытие, сделанное Уотсоном и Криком [13], что если основания в ДНК соединены попарно водородными связями, то общие размеры пар аденина и тимина и пар гуанина и цитозина оказываются одинаковыми. Значит, молекула ДНК, содержащая такие пары, обладала бы высокой упорядоченностью, несмотря на нерегулярность последовательности оснований. Уотсон и Крик высказали предположение, что молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей, связанных вместе посредством пар оснований. Эти пары показаны на рис. 2. Расстояния между связями, прикрепляющими основания к дезоксирибозам, совершенно

то расстояние между двумя цепями одинаково для обеих пар, так как угол между связями и линией C1—C1 одинаков для всех оснований. В таком случае геометрия дезоксирибоз и фосфатов молекулы может быть высоко упорядоченной.

Уотсон и Крик построили двухнитчатую модель такого типа, в которой цепи спиральны и основные параметры соответствуют данным рентгеноструктурного анализа. В этой модели полинуклеотидные нити закручены друг вокруг друга, а направление последовательности атомов в одной цепи противоположно направлению атомов в другой. В результате, если молекулу перевернуть вверх ногами, цепи оказываются идентичными, и все нуклеотиды в молекуле имеют одинаковую структуру и окружение. Единственной нерегулярностью остается последовательность оснований. Последовательность в одной цепи может изменяться неограниченно, но правила спаривания оснований требуют, чтобы аденин в одной цепи был связан с тиминном в другой, а цитозин — с гуанином. Поэтому последовательность в одной цепи определяется последовательностью в другой или, как говорят, комплементарна ей.

Структура молекулы ДНК в конфигурации В показана на рис. 3. Основания расположены стопкой, расстояния между ними равны $3,4\text{\AA}$, а плоскости их почти перпендикулярны оси спирали. Плоскости оснований не могут связывать молекулы воды. Поэтому, если ДНК находится в водной среде, то основания притягиваются друг к другу. Наряду с водородными связями пар оснований такое гидрофобное взаимодействие стабилизирует структуру.

ГИПОТЕЗА УОТСОНА — КРИКА О РЕПЛИКАЦИИ ДНК.

ПЕРЕНОС ИНФОРМАЦИИ

ОТ ОДНОЙ ПОЛИНУКЛЕОТИДНОЙ НИТИ К ДРУГОЙ

Способность снимать с себя точные копии очень существенна для генетического материала. В противном случае рост привел бы к беспорядку, жизнь не могла бы возникнуть, а естественный отбор не сохранил бы приспособившихся форм. Спаривание оснований предусматривает способ саморепликации [14]. Предполагается, что оно же представляет и основу для переноса информации на разных этапах синтеза белка.

Генетическая информация записана в последовательности четырех оснований в полинуклеотидной нити с помощью четырехбуквенного кода. Эта информация может быть перенесена от одной полинуклеотидной нити к другой. Полинуклеотидная нить действует как матрица, на которой выстраиваются нуклеотиды при построении новой цепи. Если образованная таким способом двухцепочечная молекула абсолютно упорядочена, то спаривание оснований обеспечивает точную комплементарность последовательности оснований в новой нити последовательности оснований родительской нити. Если затем две эти цепи разделяются, то в качестве матрицы может действовать уже новая цепь, и на ней образуется цепь следующего поколения. Она идентична исходной нити. Большинство молекул ДНК состоит из двух нитей. Ясно, что для репликации такой молекулы может быть использован процесс копирования. Этот процесс может использоваться также и для переноса информации от нити ДНК к нити РНК (считают, что так и происходит при образовании информационной РНК).

Спаривание оснований дает также возможность части одной полинуклеотидной нити специфически присоединяться к комплементарной последовательности другой нити. Может быть, посредством такого специфического взаимодействия и происходит прикрепление аминокислоты к соответствующему участку полинуклеотидной цепи, кодирующей после-

довательность аминокислот белка. В этом случае аминокислота связывается с молекулой транспортной РНК, а часть полинуклеотидной нити этой РНК спаривается с кодирующей нитью.

После того, как в 1953 г. Уотсон и Крик описали спаривание оснований, появилось много данных о размерах пуринов и пиримидинов, а также и о длине водородных связей. На рис. 2 учтены новые данные (которыми мы обязаны С. Арнотту). Сейчас считается, что расстояние между атомами С1 равно $10,7\text{\AA}$, а не $11,0\text{\AA}$, как думали до недавнего времени. Эта поправка вызвана в основном новыми данными о связях $N - H \cdots N$. Оказалось, что расстояния между атомами азота в кольце на $0,2\text{\AA}$ короче, чем между атомами, не входящими в кольцо. Водородные связи при спаривании оснований совершенно линейны, а длины связей такие же, как и определенные в кристаллах (эти длины различаются примерно на $0,04\text{\AA}$).

Поразительная точность спаривания оснований отражает точность репликации ДНК. Удивительно, однако, почему точность столь велика, ибо затраты энергии на деформацию пары оснований, приводящую к уже значительно меньшему совершенству, не превышают вероятно одного кванта тепловой энергии. Объяснение может заключаться в том, что процесс репликации является процессом кооперативным, затрагивающим одновременно много пар оснований. Как бы то ни было, следует подчеркнуть, что специфичность спаривания оснований зависит от связей, присоединяющих основания к дезоксирибозе. Для специфического спаривания необходимо, чтобы эти связи были правильно расположены по отношению друг к другу. Такое расположение оснований определяется, вероятно, ферментом, осуществляющим полимеризацию ДНК. Каков бы ни был механизм этого процесса, точной репликации должно способствовать то, что все нуклеотиды в двойной спирали расположены совершенно одинаково. Ошибки в процессе копирования происходят, вероятно, когда возникают таутомерные сдвиги протонов, участвующих в водородных связях, или при химическом изменении оснований. Эти ошибки могут соответствовать мутациям.

УНИВЕРСАЛЬНОСТЬ ПРИРОДЫ И ПОСТОЯНСТВО СПИРАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК

После того как было проведено предварительное рентгеноструктурное исследование, мой друг Леонард Гамильтон прислал мне ДНК человека, которую он с Ральфом Барклеем выделили из лейкоцитов больного хроническим миелоидным лейкозом. Он изучал обмен нуклеиновых кислот у человека в связи с проблемой рака и хотел сравнить ДНК из нормальных и лейкемических лейкоцитов. ДНК дала очень четкую дифракционную картину. Так началось сотрудничество, которое продолжалось много лет и в котором мы использовали различные соли ДНК, полученные от Гамильтона, чтобы подтвердить реальность двухнитчатой спиральной структуры. Гамильтон выделял ДНК из разных тканей очень многих видов. В результате было показано, что ДНК двухспиральна и в инертном генетическом материале (в спермии или бактериофаге), и в клетках (как было обнаружено различий в структуре ДНК из нормальной и раковой тканей. Фракции ДНК тимуса телят, обладающие разным нуклеотидным составом, разделенные моим коллегой Джеффри Брауном, также обладали одинаковой структурой.

В сотрудничестве с Гарриет Эфрусс-Тейлор мы также изучили активное трансформирующее вещество из пневмококков и установили, что и там содержится ДНК того же строения. Единственным открытым пока исключением является однонитчатая ДНК из некоторых очень мелких



РИС. IV-4.

Картина диффракции рентгеновых лучей на сперме головоногих.

Оси молекул ДНК в головках спермиев направлены вертикально. Сильные рефлексы вверху и внизу соответствуют расстоянию в 3,4 Å между основаниями. Резкие рефлексы в центре показывают, что молекулы закристаллизованы.

И. Гершкович



РИС. IV-5.

Фотография диффракции рентгеновых лучей на волокнах ДНК при большой влажности (конфигурация *B*).

Волокна вертикальны. Рефлексы, соответствующие 3,4 Å, находятся вверху и внизу. Угол в X-образной центральной картине соответствует постоянному углу подъема полинуклеотидной цепи в спиральной молекуле (фотография получена совместно с Г. Р. Уилсоном; ДНК выделил Л. Д. Гамильтон)



РИС IV-6.

Диффракция рентгеновых лучей на микрокристаллических фибриллах ДНК. Общее распределение интенсивностей напоминает таковое на рис IV-4, но диффракция распадается на резкие рефлексы в результате упорядоченного расположения молекул в кристаллах. Резкие рефлексы позволяют разрешить расстояния до 1,7 Å (фотография получена совместно с Н. Чардом; ДНК выделил Л. Д. Гамильтон)

бактериофагов. Однако мы обнаружили, что ДНК с очень высоким содержанием аденина или с глюкозой, прикрепленной к оксиметилцитозину, кристаллизуются не совсем обычно.

СТРУКТУРА ДНК — НЕ АРТЕФАКТ

Вероятно, недостаточно изучать диффракцию рентгеновых лучей только на чистой ДНК. Естественно было бы попытаться взглянуть и на генетически изолированной ДНК отличается от той, которая имеется *in vivo*, где ДНК зали, что в головках спермиев молекулы сильно упорядочены и поэтому этот объект великолепно подходит для рентгеноструктурного анализа. В то же время хромосомы большинства типов клеток оказываются очень сложными объектами, у которых есть лишь слабые намеки на упорядоченность структуры. Рендалл интересовался этим вопросом в течение нескольких лет и подтолкнул Гозлинга на исследование спермиев барана. Палочкообразные спермии, которые, как обнаружил Шмидт, обладают сильной оптической анизотропией, должны были оказаться прекрасным объектом для рентгеноструктурного исследования. Ривин [17], изучая жидкие кристаллы различной природы, уже получил картины диффракции на этих спермиях. Но его техника была, по-видимому, несовершенной, так как он пришел к ошибочному выводу, согласно которому нуклеопротеид находится в жидко-кристаллическом состоянии. Полученные нами фотографии [18] ясно показали, что материал в головках спермиев обладает упорядоченностью в трех измерениях, т. е. находится в кристаллическом, а не жидко-кристаллическом состоянии. Картина диффракции (рис. 4) похожа на полученную для ДНК (рис. 5). Это показывает, что структура в волокнах очищенной ДНК в основном не является артефактом. Работая на Зоологической станции в Неаполе, я обнаружил, что можно ориентировать головки спермиев в волокнах. Хорошие диффракционные картины получаются от интактных влажных сперматофор, являющихся пакетами естественно ориентированных спермиев. Картины диффракции, похожие на полученные для ДНК, получены также и для бактериофага Т2, предоставленного мне Уотсоном.

ДИФФРАКЦИЯ РЕНТГЕНОВЫХ ЛУЧЕЙ НА ДНК И РАЗЛИЧНЫЕ КОНФИГУРАЦИИ МОЛЕКУЛЫ

Диффракционный анализ является единственным методом, который может дать подробную информацию о конфигурации молекулы ДНК. Оптические методы исследования, хотя и имеют ценность как дополнение к рентгеноструктурному анализу, дают гораздо меньше информации, причем указывают в основном на ориентацию связей и групп. Рентгеноструктурные исследования способствовали установлению структуры ДНК в два этапа. Во-первых, они дали информацию, которая помогла построить модель Уотсона — Крика. Во-вторых, они показали, что модель Уотсона — Крика в основе своей верна; исходя из этих данных, она была уточнена и исправлена.

Рентгеноструктурные исследования (например, [19] и [20]) показали, что молекулы ДНК принимают большое количество различных конформаций, большая часть которых может существовать в нескольких кристаллических формах. Содержащие в волокне воды, солей и катионов, используемых для нейтрализации фосфатных групп, является главным фактором, определяющим конформацию молекулы и форму кристалла (табл. 1).

Таблица 1

СВОДНЫЕ ДАННЫЕ О РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ДНК В ВОЛОКНАХ

| Конфигурация молекулы | Число пар нуклеотидов на виток спирали | Наклон пары оснований в молекуле | Соль | Необходимая относительная влажность и другие условия | Кристаллическая группа | Кристалличность | Положение молекулы | Размеры элементарной ячейки | | | |
|-----------------------|--|----------------------------------|---------------------|--|------------------------|---------------------|---|-----------------------------|-------|-------|---------|
| | | | | | | | | a(Å) | b(Å) | c(Å) | β |
| A | 11,0 | 20 | Na K Rb | 75% | Моноклинная | Кристаллическая | 0, 0, 0 1/2, 1/2, 0 | 22,24 | 40,62 | 28,15 | 97,0 |
| B | 10 | ~0 | Li | 66% 3% LiCl в волокне | Орторомбическая | Кристаллическая | 0, 0, 1/6 1/2, 1/2, 1/6 | 22,5 | 30,9 | 33,7 | — |
| | | | Li | 75—90% | Орторомбическая | Полукристаллическая | 0, 0, 1/8 1/2, 1/2, 1/8 | 21,4 | 38,5 | 33,6 | — |
| | | | Li Na K Rb | 92% | Гексагональная | Полукристаллическая | 0, 0, 0 1/3, 2/3, 1/6 2/3, 1/3, 1/6 | 46 | — | 34,6 | — |
| B ₂ | 9,9 | 0? | Na | 75% под натяжением | Тетрагональная | Полукристаллическая | 0, 0, 0 1/2, 1/2, 1/4 | 27,4 | — | 33,8 | — |
| C | 9,3 | —5 | Li | 44% без LiCl | Орторомбическая | Полукристаллическая | 0, 0, 1/8 1/2, 1/2, 1/8 | 20,1 | 31,9 | 30,9 | — |
| | | | Li | 44%, только в некоторых образцах. Без LiCl в волокне | Гексагональная | Полукристаллическая | 0, 0, 0 или 1/2 1/3, 2/3, 1/6 или 1/3 2/3, 1/3, 1/6 или 1/3 | 35,0 | — | 30,9 | — |

Я кратко опишу три основные конфигурации ДНК. Во всех случаях данные дифракции удовлетворительно объясняются на основе все той же структуры Уотсона — Крика. Это гораздо сильнее убеждает в правильности структуры, чем если бы была изучена лишь одна конфигурация ДНК. Конфигурация молекулы определяется путем построения такой молекулярной модели, для которой вычисление интенсивности дифракции соответствуют тем, что были получены на опыте [19].

Как и при большинстве методов рентгеноструктурного анализа, при дифракции определяются лишь интенсивности, но не фазы пучков. Поэтому из таких данных нельзя прямо вывести структуру. Конечно, если бы разрешение было достаточным для того, чтобы различить большинство атомов в структуре, то структуру можно было бы определить, не выдвигая особых стереохимических предположений, а принимая лишь, что известна средняя величина атомов, из которых состоит молекула. Однако посредством одного лишь рентгеноструктурного анализа нельзя определить положение большинства атомов в ДНК (рис. 7). Поэтому делаются более обширные стереохимические предположения, которые выливаются в построение моделей молекулы. Большинство предположений не имеет других альтернатив, но там, где возможна альтернатива (например, в расположении водородных связей при спаривании оснований), нужно использовать данные рентгеноструктурного анализа для того, чтобы установить правильность предположения. Иными словами, необходимо установить, что предполагаемая структура является единственно возможной.



РИС. IV-9.

Диффракция рентгеновых лучей на микрокристаллах волокон ДНК в конфигурации А (фотография получена совместно с Г. Р. Уилсоном; ДНК выделил Л. Д. Гамильтон)

И. Гершкович

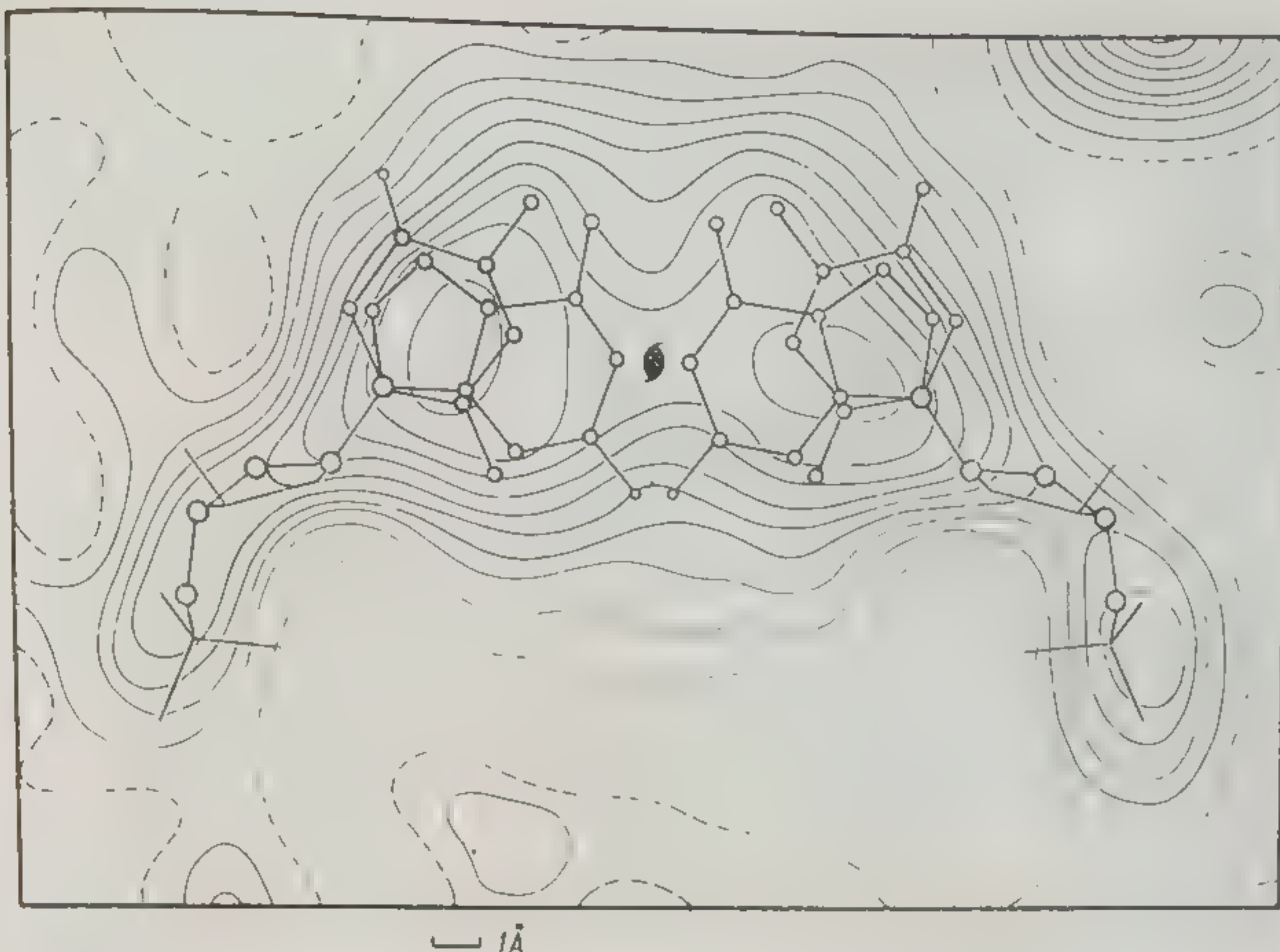


РИС. IV-7.

Фурье-синтез (проведенный С. Арноттом), который показывает распределение электронной плотности в плоскости пары оснований в ДНК, находящейся в В-форме.

Распределение соответствует усредненной паре. На карте видна форма пары оснований, но не разрешены отдельные входящие в нее атомы. Фурье-синтез уточняется, а в карту вносятся соответствующие исправления. Контурные линии проведены через каждые $2 \text{ E}/\text{\AA}^2$; уровень нулевой плотности проведен пунктиром

В последние годы наша работа велась именно в таком направлении. Чтобы удостовериться в правильности гипотетической структуры ДНК, нужно было собрать по возможности все данные рентгеноструктурного анализа.

В-КОНФИГУРАЦИЯ

На рис. 5. приведена картина диффракции на волокне ДНК при высокой влажности, когда молекулы разделены водой и более или менее независимы друг от друга. Мы не исследовали детально ДНК при таких условиях. Можно было бы получить картины получше, но и эти достаточно определены: резкость многих рефлексов указывает на то, что молекулы обладают упорядоченной структурой. Эта конфигурация известна как В-конфигурация (см. также рис. 3). Она наблюдается *in vivo*; известны доказательства того, что ДНК, растворенная в воде, находится именно в этой форме. В этой конфигурации на один оборот спирали приходится 10 пар нуклеотидов. Нет очевидных причин к тому, чтобы это число было целым. Но если это действительно так, то значение этого пока не ясно.

Когда ДНК кристаллизуется, процесс кристаллизации накладывает на молекулу ограничения и может привести к сильному ее упорядочению. Периодичность расположения молекул в микрокристаллах волокна увеличивает резкость рефлексов, соответствующих плоскостям кристалла (рис. 6). Тщательные измерения положений рефлексов и определение кристаллической решетки дают возможность выяснить, как направлены отражения. Картины диффракции от большинства волокнистых веществ двумерны и похожи на рис. 5. В отличие от этого, кристаллические волокна ДНК

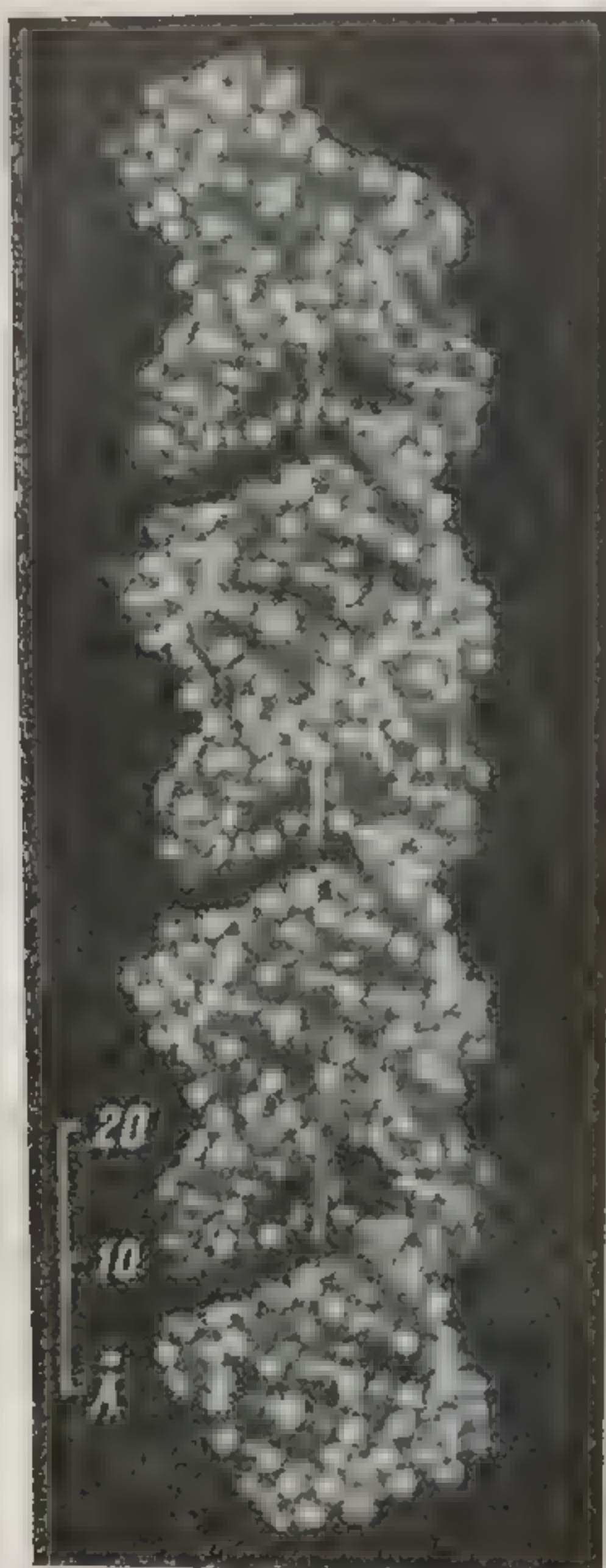


РИС. IV-8.

Молекулярная модель ДНК в конфигурации А.

Видно, что плоскости оснований наклонены под углом 20° к горизонтали

либо особым образом. Конформация нуклеотидов очень похожа на такую в В-форме. Различия между картинками дифракции на формах В и С вызваны изменением положения нуклеотидов в спирали. Сравнение этих форм еще больше подтверждает правильность структуры. Это напоминает попытку определить структуру гнутого кресла, наблюдая за его тенями: если конформация кресла слегка изменена, то структура его видна яснее.

СПИРАЛЬНАЯ СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЫ РНК

РНК, в отличие от ДНК, дает бедные рефлексными картинками дифракции. Хотя получить их пытались разные исследователи, в том числе и мы. Многие данные указывают на то, что РНК содержит спиральные участки. Например, оптические свойства растворов РНК ясно показывают (например, [21]), что основания в участках молекул РНК расположены стопкой, а структура этих участков спиральна, что делает их похожими на ДНК. Рентгенографические исследования синтетических полирибонуклеотидов также показывают, что РНК напоминает ДНК [22]. Картинки дифракции на РНК [23], в общем, похожи на те, которые получаются на ДНК, но природу их трудно различить из-за их

дают довольно полную трехмерную картину дифракции. Эти данные дают информацию о виде молекулы под любыми углами зрения и сопоставимы с данными, полученными на отдельном кристалле. Можно использовать метод трехмерного синтеза Фурье (рис. 7), и тогда структура определяется вполне надежно.

А-КОНФИГУРАЦИЯ

В этой конформации на оборот спирали в молекуле приходится 11 пар нуклеотидов. Шаг спирали равен 28Å . Относительные расположения и ориентации оснований, дезоксирибоз и фосфатных групп существенно отличаются от таковых в В-форме. В частности, пары оснований отклонены на 20° от перпендикуляра к оси спирали (рис. 8).

А-форма ДНК (рис. 1) была первой обнаруженной кристаллической формой. *In vivo* она не наблюдается и тем не менее представляет особый интерес, так как очень похожую спиральную конфигурацию принимает РНК. Полное значение А-формы ДНК, вероятно, будет вскоре раскрыто. Хорошая фотография дифракционной картины на А-форме приведена на рис. 9.

С-КОНФИГУРАЦИЯ

Эту форму можно считать артефактом, получающимся при частичном высушивании. Спираль не целая, на виток приходится примерно $9\frac{1}{3}$ пар нуклеотидов. Спирали упаковываются вместе, образуя полукристаллическую структуру. Положения нуклеотидов в соседних молекулах не связаны каким-

дезориентации и диффузности. Основную трудность представляло то, что появлялось в виде сильных меридиональных рефлексов при $3,3\text{\AA}$ и 4\AA . Их нельзя было интерпретировать исходя из спиральной структуры.

В первых работах препараты РНК были гетерогенными. Мы думали, что гораздо более гомогенная РНК растительного вируса даст лучшую картину, но эти надежды не оправдались. Однако, когда стали доступны препараты рибосомальной и «растворимой» РНК, мы почувствовали, что перспективы для структурного анализа улучшаются. Мы решили сконцентрировать свои усилия на изучении «растворимой» РНК в основном потому, что Джеффри Браун в нашей лаборатории приготавливал большие количества высокоочищенной транспортной РНК для своих физических и химических исследований. Он также разделил их на различные транспортные РНК, специфичные для включения в белок определенных аминокислот. Эта РНК привлекала нас по многим причинам: молекулы ее необычно малы для нуклеиновой кислоты; существовали указания, что она может иметь регулярную структуру; она обладает важной биохимической ролью, но многие стороны ее функционирования неизвестны.

Мы обнаружили, что ориентировать транспортную РНК в волокнах очень трудно. Однако, внимательно разглядывая в препаровальную лупу гели РНК в сухой атмосфере, я обнаружил, что можно сделать волокна со столь же высоким двойным лучепреломлением, что и у ДНК. Но и эти волокна дали дифракционную картину не лучше тех, что получались для других типов РНК, так как при повышении содержания воды в фибриллах молекулы дезориентировались. Уотсон, Фуллер, Микаел Спенсер и я работали много месяцев, пытаясь улучшить образцы для рентгенографического исследования. Мы не могли добиться успеха до тех пор, пока Спенсер не нашел образец, который дал несколько тусклые, но резкие дифракционные кольца сверх обычной для РНК диффузной картины. Этот образец состоял из геля РНК, запечатанного в маленькую ячейку для

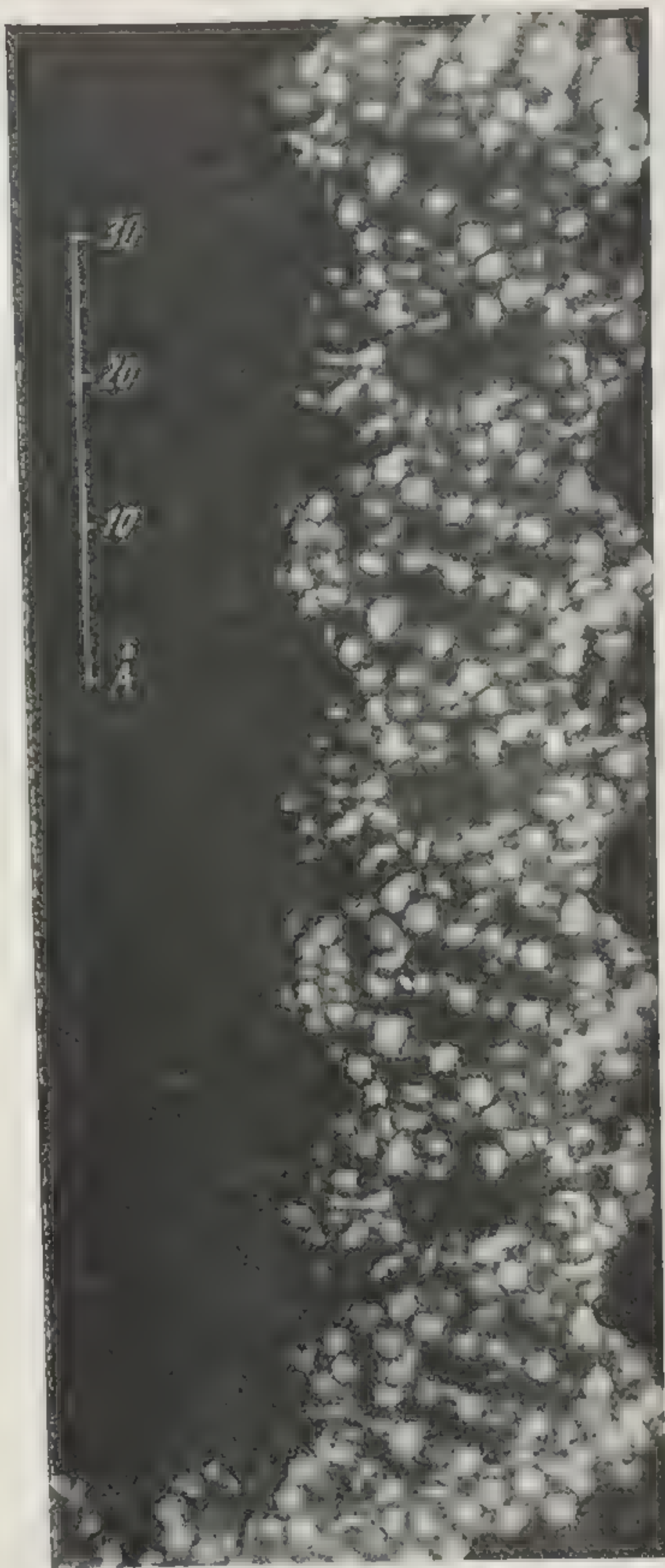


РИС. IV-12.

Модель молекулы транспортной РНК

рентгенографического исследования. Оказалось, что гель постепенно высох в результате утечки. Диффракционные кольца были настолько резкими, что мы были почти уверены, что они вызваны кристаллической примесью; при рентгенографических исследованиях биохимических препаратов это не редкость. Было похоже, что этот образец РНК давал кольца, обусловленные примесью ДНК. Поэтому эти кольца не очень-то обнадеживали нас. Однако через несколько недель Спенсер исключил все другие возможности—он ясно показал, что кольца обусловлены самой РНК. Ему удалось получить еще более яркие кольца, контролируя постепенное высушивание. С помощью усовершенствованного устройства, которое мы разработали для вытягивания РНК, и используя гель, постепенно сконцентрированный Брауном, Фуллер ориентировал РНК, не нарушив ее кристалличности. Эти волокна дали четкую и определенную картину диффракции; при гидратации фибрилл ориентация не исчезала. Оказалось, что методы вытягивания фибрилл, которые я ранее использовал, полностью разрушали кристалличность. Если бы вместо этого сначала допускали медленную кристаллизацию материала, то вытягивание ориентировало бы микрокристаллы, а заодно и молекулы РНК. Отдельные же молекулы были слишком малы, чтобы их можно было ориентировать без агрегации, которая достигается при кристаллизации. Неожиданно обнаружилось, что из всех исследованных нами типов РНК транспортная РНК, которая обладала наименьшим молекулярным весом, ориентировалась лучше всего.

Картины диффракции от транспортной РНК получились резкими и хорошо ориентированными [24]. В результате выявилось поразительное сходство диффракции от РНК и от А-формы ДНК (рис. 10). Удалось устранить трудность, связанную с двумя рефлексами при 3,4 Å и 4 Å (рис. 11). В картинах диффракции на РНК положения трех рефлексов, указанных стрелками, отличались от тех, которые характерны для ДНК. В результате, когда молекулы были плохо ориентированы, эти три рефлекса перекрывались и казались двумя. Несомненно, что РНК обладает правильной спиральной структурой, которая почти идентична структуре ДНК в А-форме. Различия между картинами диффракции на РНК и ДНК можно отнести за счет небольших различий этих двух структур.

Из сходства структуры РНК и ДНК следует, что РНК должна содержать последовательности оснований, которые полностью (или по крайней мере большей частью) комплементарны. В молекуле около 80 нуклеотидов. Самая простая структура, сопоставимая с результатами рентгеноструктурного анализа, состоит из одной полинуклеотидной цепи, которая закручена сама на себя, так что одна половина цепи связана с другой посредством спаривания оснований. Эта структура показана на рис. 12. Следует подчеркнуть, что, хотя мы уверены в правильности спиральной структуры, мы не знаем, действительно ли оба конца цепи находятся на конце молекулы. Цепь могла бы быть закручена с обоих концов молекулы, так что концы цепи находились бы где-то в середине спирали. Известно, однако, что аминокислоты присоединяются к концу цепи, которая оканчивается последовательностью оснований цитозин-цитозин-аденин.

СВЯЗЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ РНК С ФУНКЦИЕЙ

Построение молекулярных моделей показывает, что в петле на конце молекулы транспортной РНК должно быть три или более нуклеотидов. В нашей модели петля состоит из трех нуклеотидов, которые не связаны водородными связями. Может быть, эта тройка оснований и есть та часть молекулы, которая присоединяется к соответствующему участку полинуклео-

тидной цепи кодирующей РНК, определяющей последовательность аминокислот в полипептидной цепи белка. Считают, что каждой аминокислоте соответствует в кодирующей РНК тройка оснований. Триплет в транспортной РНК мог бы специфически прикрепляться к кодирующему триплету водородными связями с образованием пар оснований. Надо подчеркнуть, однако, что эти представления умозрительны.

Мы предполагаем, что часть молекулы транспортной РНК специфически взаимодействует с ферментом, участвующим в присоединении аминокислоты к РНК. Но мы не знаем, как это происходит. Столь же мало мы знаем и о том, как взаимодействует с ДНК фермент, участвующий в ее репликации, равно как и о других аспектах механизма репликации ДНК. Наличие в молекуле транспортной РНК комплементарных последовательностей оснований наводит на мысль, что она может, как и ДНК, самореплицироваться. Но пока в пользу этого имеется мало данных. Картины дифракции на вирусной и рибосомной РНК показывают, что в молекулах также есть спиральные участки, функция которых тоже неизвестна.

Открытие молекулярной структуры ДНК немедленно привело к появлению гипотезы о механизме ее репликации. Это было обусловлено простотой структуры ДНК. По-видимому, структура и функция молекулы в большинстве случаев непосредственно связаны друг с другом. Обнаружение спиральной конфигурации молекул РНК является первым шагом к объяснению функции РНК. Однако для создания адекватной картины функционирования РНК может потребоваться более полная информация о ее структуре, например, определение последовательности оснований, а также больше знаний о взаимодействии разных типов РНК в рибосоме.

ВОЗМОЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВАНИЙ В ТРАНСПОРТНОЙ РНК НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ДИФФРАКЦИИ РЕНТГЕНОВЫХ ЛУЧЕЙ

Биологическая специфичность нуклеиновых кислот, по-видимому, целиком определяется последовательностью составляющих их оснований. Поэтому сегодня наиболее фундаментальной проблемой в исследовании нуклеиновых кислот является, вероятно, определение этих последовательностей. Количество оснований в ДНК слишком велико, чтобы можно было определять их последовательность по данным дифракции. Однако число оснований в транспортной РНК не так велико. Два наблюдения указывают на возможность полного структурного анализа транспортной РНК с помощью рентгеновых лучей. Во-первых, мы наблюдали (рис. 13) в картинах дифракции на транспортной РНК отдельные пятна, каждое из которых соответствует отдельному кристаллу РНК. По нашей оценке их размер около 10 мк. Эта оценка подтверждается тем, что в поляризационный микроскоп видны участки с двойным лучепреломлением, которые являются, вероятно, кристаллами. Наверное, не слишком трудно вырастить в несколько раз больший кристалл, который уже годился бы для рентгенографического исследования.

Второе наблюдение, которое обнадеживает нас, состоит в том, что ограниченное разрешение рентгенографических данных для ДНК обусловлено почти исключительно дезориентацией монокристаллов в волокнах ДНК. Данные по интенсивности рефлексов для ДНК показывают, что температурный фактор ($B = 4\text{Å}$) для ДНК тот же, что и для простых соединений. Поэтому представляется, что кристаллы ДНК обладают довольно совершенной кристаллическостью; если бы можно было наблюдать за отдельными кристаллами ДНК, то данных об интенсивности рефлексов было бы достаточно для определения точного положения каждого атома

в молекуле (не говоря уже об аперподической последовательности оснований).

Мы изучаем возможность получения монокристаллов ДНК, но больше нас волнует задача получения столь же совершенных монокристаллов транспортной РНК, которые наблюдаются в случае ДНК, и последующего определения последовательности оснований. Пока кристаллы РНК получаются гораздо менее совершенными, чем кристаллы ДНК. Но большинство наших опытов мы проделали с препаратами РНК, содержащими смесь молекул РНК, специфичных для разных аминокислот. Мы редко использовали РНК, которая была бы специфична в основном только для одной аминокислоты, и надеемся, что можно будет получить такие препараты РНК, которые состоят из молекул лишь одного типа. Можно надеяться, что такие РНК будут образовывать столь же совершенные кристаллы, что и кристаллы ДНК. В таком случае ничто не мешает провести прямой анализ всей структуры молекулы, включая и последовательность оснований, и «петлю» на конце. Может быть, мы слишком оптимистичны, но причина этого оптимизма кроется в недавних и несколько неожиданных успехах диффракционного анализа при изучении нуклеиновых кислот и белков.

ЛИТЕРАТУРА

1. T. Caspersson. *Naturwiss.*, 1941, 29, 33.
2. J. Brachet. *Arch. Biol. Liège*, 1942, 53, 207.
3. O. T. Avery, C. M. MacLeod and M. McCarty. *J. Exp. Med.*, 1944, 79, 137.
4. R. Signer and H. Schwander. *Helv. Chim. Acta.*, 1949, 32, 853.
5. A. D. Hershey and M. Chase. *J. Gen. Physiol.*, 1952, 36, 39.
6. E. Chargaff. *Experientia*, 1950, 6, 201.
7. R. Signer, T. Caspersson and E. Hammarsten. *Nature*, 1938, 141, 122.
8. W. J. Schmidt. *Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma*. Berlin, 1937.
9. H. O. E. Patti. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 1932, 16, 723.
10. W. T. Astbury. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, I. Nucleic Acid. Cambridge, 1947, p. 66.
11. J. M. Gulland and D. O. Jordan. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, I. Nucleic Acid. Cambridge, 1947.
12. J. M. Gulland. *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 1947, 12, p. 95.
13. J. D. Watson and F. H. C. Crick. *Nature*, 1953, 171, 737.
14. J. D. Watson and F. H. C. Crick. *Nature*, 1953, 171, 964.
15. K. Hoogsteen. *Acta Cryst.*, 1959, 12, 822.
16. L. D. Hamilton, R. K. Barclay, M. H. F. Wilkins, G. L. Brown, H. R. Wilson, D. A. Marvin, H. Ephrussi-Taylor and N. S. Simmons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, 5, 397.
17. F. Rinne. *Trans. Faraday Soc.*, 1933, 29, 1016.
18. M. H. F. Wilkins and J. T. Randall. *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 10, 192.
19. R. Langridge, H. R. Wilson, C. W. Hooper, M. H. F. Wilkins and L. D. Hamilton. *J. Mol. Biol.*, 1960, 2, 19.
20. M. H. F. Wilkins. *J. Chim. Phys.*, 1961, 58, 891.
21. P. Doty. *Biochem. Soc., Symp.*, 1961, N 21, 8.
22. A. Rich. In: «A Symposium on Molecular Biology» (ed. Zirkle). Chicago, 1959, p. 47.
23. A. Rich. and J. D. Watson. *Nature*, 1954, 173, 995.
24. M. Spencer, W. Fuller, M. H. F. Wilkins and G. L. Brown. *Nature*, 1962, 194, 1014.

Резул
дии б
а так
в том
обусл
что Д
но что
произ
потом
ленте,
Так ж
копии,
месте
Со
белка)
одно ед
На пр
чению,
мере ча
о том, н
остаетс

СТРУКТ

Начнем
Провед
ДНК, п
сущест
всегда
содерж
нина, а
цитозин
имеющи

Приложение V

БИОСИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

А. КОРНБЕРГ

Нобелевская лекция, 1959 г.

Результаты, полученные в последние годы при изучении трансформации бактерий [1] и инфицирования бактериальных клеток вирусами [23], а также данные иного рода [3] убедили большую часть исследователей в том, что дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) является веществом, обуславливающим генетические эффекты. Поэтому мы вправе принять, что ДНК не только управляет синтезом белков и развитием клетки, но что именно она представляет собой то вещество, которое должно воспроизводиться и обеспечивать таким образом тождественное развитие потомства данной клетки на протяжении многих поколений. ДНК подобна ленте, несущей информацию, содержащую специальную инструкцию. Так же, как в случае записи на ленте, с ДНК могут быть сняты точные копии, благодаря чему информация может быть использована в другом месте и в другое время.

Составляют ли эти две функции — претворение кода в жизнь (синтез белка) и копирование кода (сохранение наследственных признаков) — одно единое целое или эти две функции могут быть отделены друг от друга? На протяжении наших пятилетних исследований мы пришли к заключению, что процесс воспроизведения ДНК можно изучать и, по крайней мере частично, понять на ферментном уровне; что же касается вопроса о том, каким образом ДНК управляет синтезом белков, то ответ на него остается тайной, скрытой внутри клетки.

СТРУКТУРА ДНК

Начнем с краткого обзора наиболее важных особенностей структуры ДНК. Проведенный многими исследователями [4] анализ состава препаратов ДНК, полученных из самых разнообразных источников, выявил одно существенное обстоятельство: оказалось, что содержание пуринов в ДНК всегда равно содержанию пиримидинов. В пределах пуриновой группы содержание аденина может значительно отличаться от содержания гуанина, а в пределах пиримидинов — содержание тимина от содержания цитозина. Но при этом всегда наблюдается равенство числа оснований, имеющих в положении 6 кольца аминогруппу, и оснований, имеющих

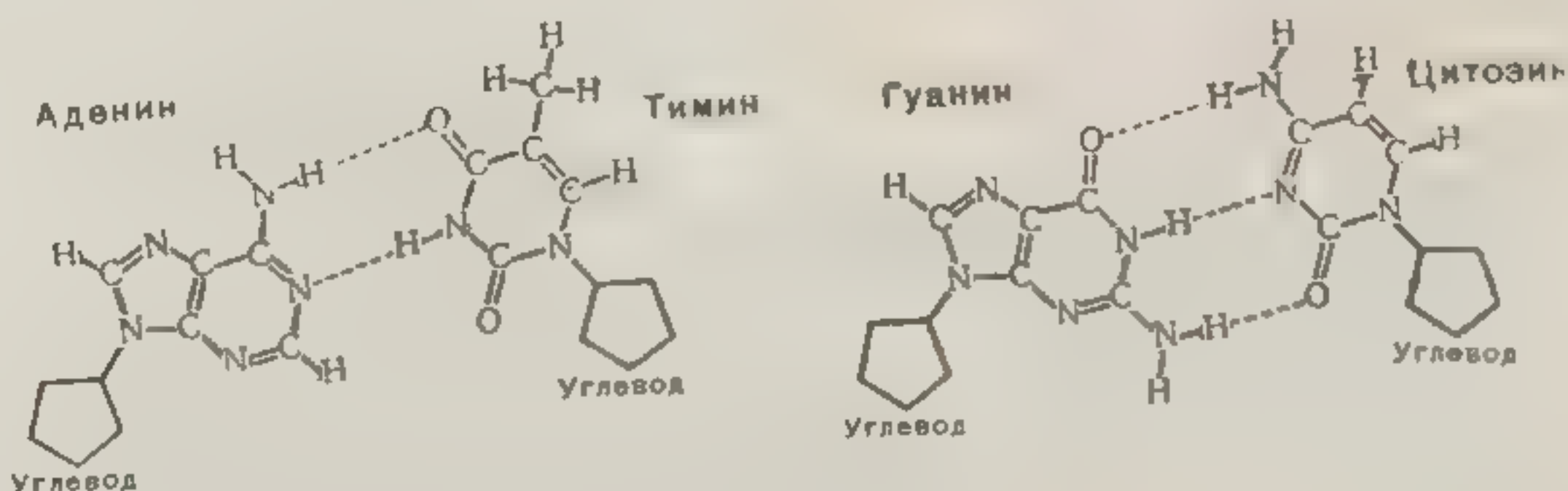


РИС. V-1.

Соединение оснований водородными связями

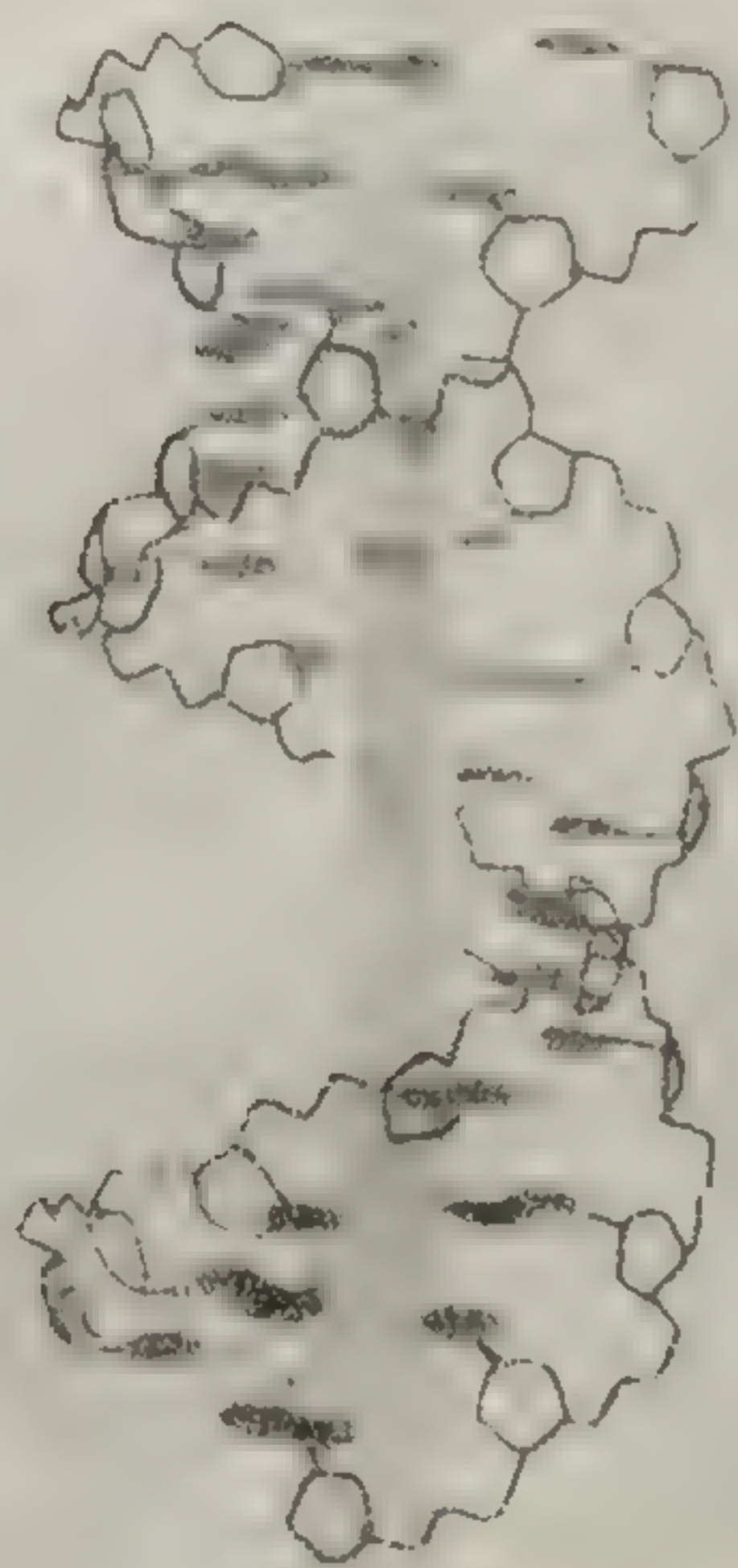


рис. V-2.

Двойная спираль молекулы ДНК
(модель Уотсона и Крика)

лярно основной оси цепочки. Рис. 3 представляет собой более детализированную молекулярную модель [7], которая дает более ясное представление о расположении атомов в этой структуре. Пуриновые и пиримидиновые основания одной из цепочек связаны водородными связями, показанными на рис. 1, с пиримидиновыми и пуриновыми основаниями комплементарной цепочки.

Рентгеноструктурные измерения показали, что расстояние между двумя цепочками модели соответствует величине, вычисленной для водородной связи, соединяющей пуриновое основание с пиримидиновым; это расстояние слишком мало для двух пуринов и слишком велико для двух пиримидинов. Наибольшее достоинство этой модели с биологической точки зрения состоит в том, что она позволяет прекрасно объяснить процесс воспроизведения ДНК в клетке. Если представить себе, что эти две цепи разъединяются и затем образуются новые, комплементарные по отношению к каждой из них, цепи, то результатом будут две двойные спирали, причем каждая из них идентична двойной родительской спирали, а каждая цепь пары идентична соответствующей цепи в другой паре.

ПОДХОД К ВОСПРОИЗВЕДЕНИЮ ДНК С ЭНЗИМОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЧКИ ЗРЕНИЯ

Хотя Уотсон и Крик и предложили механическую модель воспроизведения ДНК, мы должны поставить перед собой следующий вопрос: каков тот химический механизм, который осуществляет синтез этой супермолекулы в клетке? Около 60 лет назад сбраживание сахара дрожжами считали «жизненным» процессом, неотделимым от живой клетки; однако благодаря открытию Бухнером процесса брожения в экстрактах и бла-

в этом положении кетогруппу. Эти факты были использованы Уотсоном и Криком [5] в предложенной ими гипотезе структуры ДНК. Эти авторы предположили (рис. 1), что 6-аминогруппа аденина связана водородными связями с 6-кетогруппой тимина, а гуанин связан аналогичным образом с цитозином и что в этом заключается причина равенства числа пуринов и пиримидинов.

Исходя из этих представлений, а также из результатов рентгенокристаллографических измерений Вилкинса и его сотрудников [6], Уотсон и Крик предположили, что ДНК построена из двух длинных обвивающих друг друга цепочек, образующих двойную спираль. На рис. 2 схематически изображен фрагмент цепочки ДНК, состоящий приблизительно из 10 нуклеотидных единиц. Согласно физическим измерениям, цепочки ДНК состоят в среднем из 10 000 нуклеотидных единиц. Как видно из схемы, дезоксирибозные кольца связаны фосфатными остатками и образуют хребет цепочки; пуриновые и пиримидиновые кольца представляют собой плоскостные структуры, расположенные перпендику-

годаря
вой по
сма
опреде
довате
состав

5 л
сма
Некот
вались
химик
сгора
вмеш
клетки
сти ли
мрачн
лись,
пессим
ситель
структ
функци

В э
ные со
гих фак
довател
энзимол
нокисл

Я
ше, что
к проб
кислот
биосинт
коферм
данным
дологии
дований
уверенн
биосинт
единица
ются а
фосфаты
ные пут
мидино
леозид-
нования
образу
рых спе
вестны
нуклеот
образу
процесс
нуклеин
синтеза
щихся са
конденс
ло, что

годаря успехам энзимологии в первой половине XX в. мы теперь рассматриваем дрожжевое брожение как определенную, известную нам последовательность химических реакций, составляющих единое целое.

5 лет назад синтез ДНК тоже рассматривали как «жизненный» процесс. Некоторые исследователи придерживались тогда того мнения, что биохимики должны исследовать процесс сгорания веществ в клетке, но не вмешиваться в генетический аппарат клетки, поскольку это может привести лишь к путанице. Однако эти мрачные предсказания не подтвердились, так же как не оправдалась пессимистическая точка зрения относительно исследования клеточной структуры и ее специализированной функции.

В энзимологии назревают крупные события, и объяснения многих фактов можно ожидать от исследователей, работающих в области энзимологии углеводов, жиров, аминокислот и нуклеиновых кислот.

Я убежден сейчас, как и раньше, что для плодотворного подхода к проблеме биосинтеза нуклеиновых кислот важно понимать механизм биосинтеза простых нуклеотидов и коферментов и хорошо владеть этими данными и связанной с ними методологией. Именно на основании исследований такого рода мы приобрели уверенность в том, что основными биосинтетическими строительными единицами нуклеиновых кислот являются активированные нуклеозид-5'-фосфаты [8]. Как известно, все основные пути биосинтеза пуринов и пиримидинов приводят к образованию нуклеозид-5'-фосфатов [8]; свободные основания или нуклеозиды обычно не образуются, если не считать некоторых специальных случаев. Нам известны также 2'-и 3'-изомеры этих нуклеотидов, однако они, вероятно, образуются в результате каких-то процессов ферментативного распада нуклеиновых кислот. Изучение биосинтеза коферментов [9], являющихся самыми простыми продуктами конденсации нуклеотидов, показало, что при конденсации аденозин-

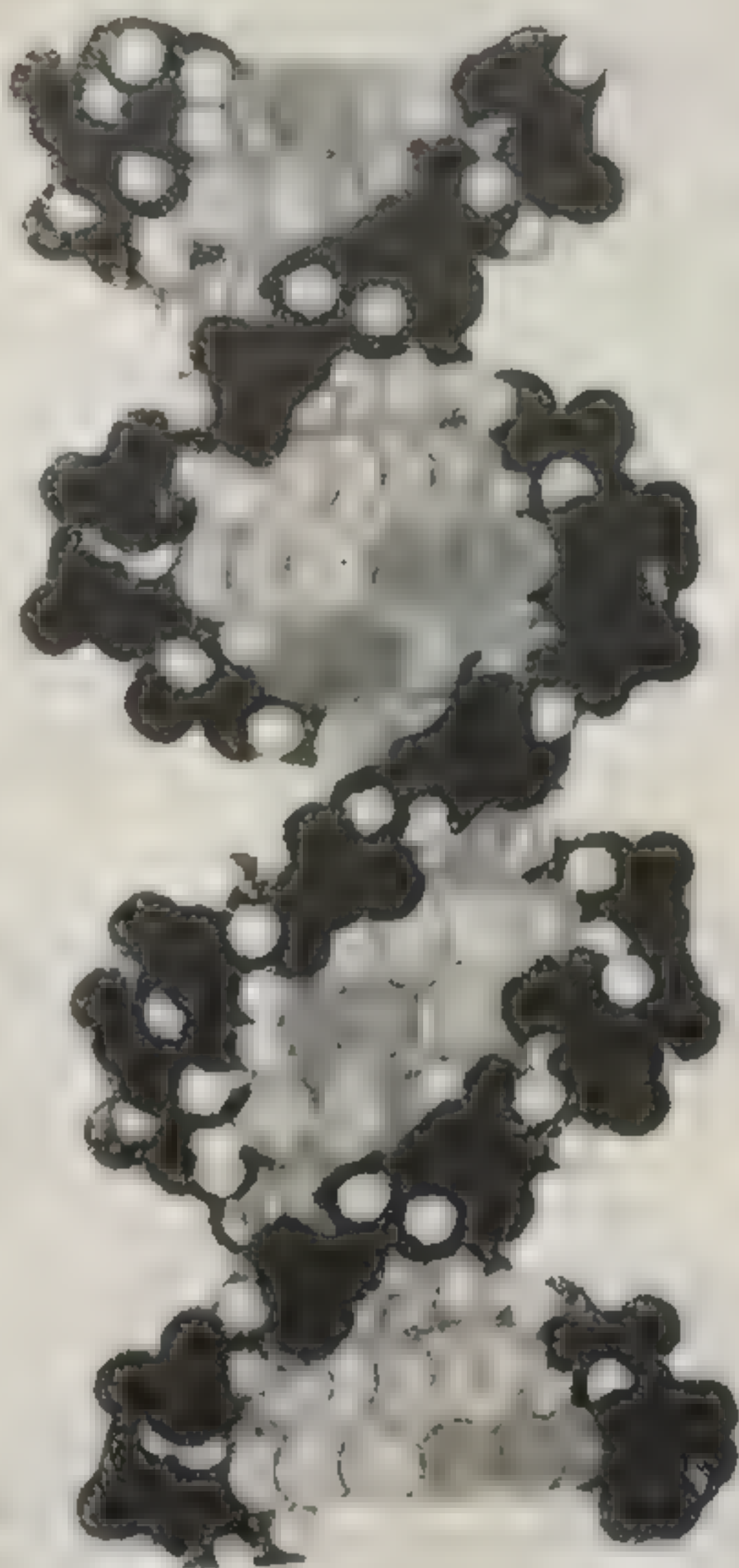


РИС. V-3.

Молекулярная модель ДНК (по М. Feughelman и др.)

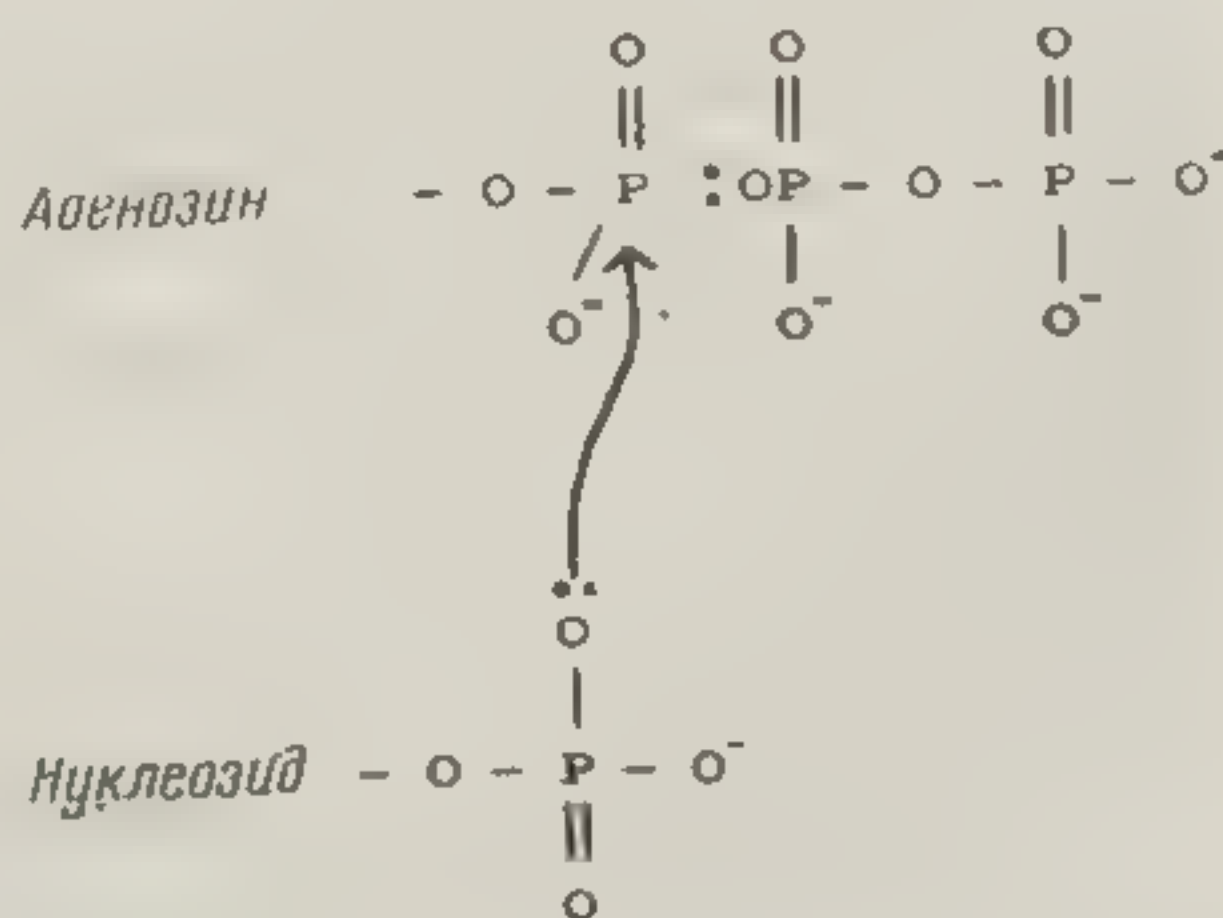


РИС. V-4.

Нуклеофильное воздействие нуклеозид-монофосфата на АТФ

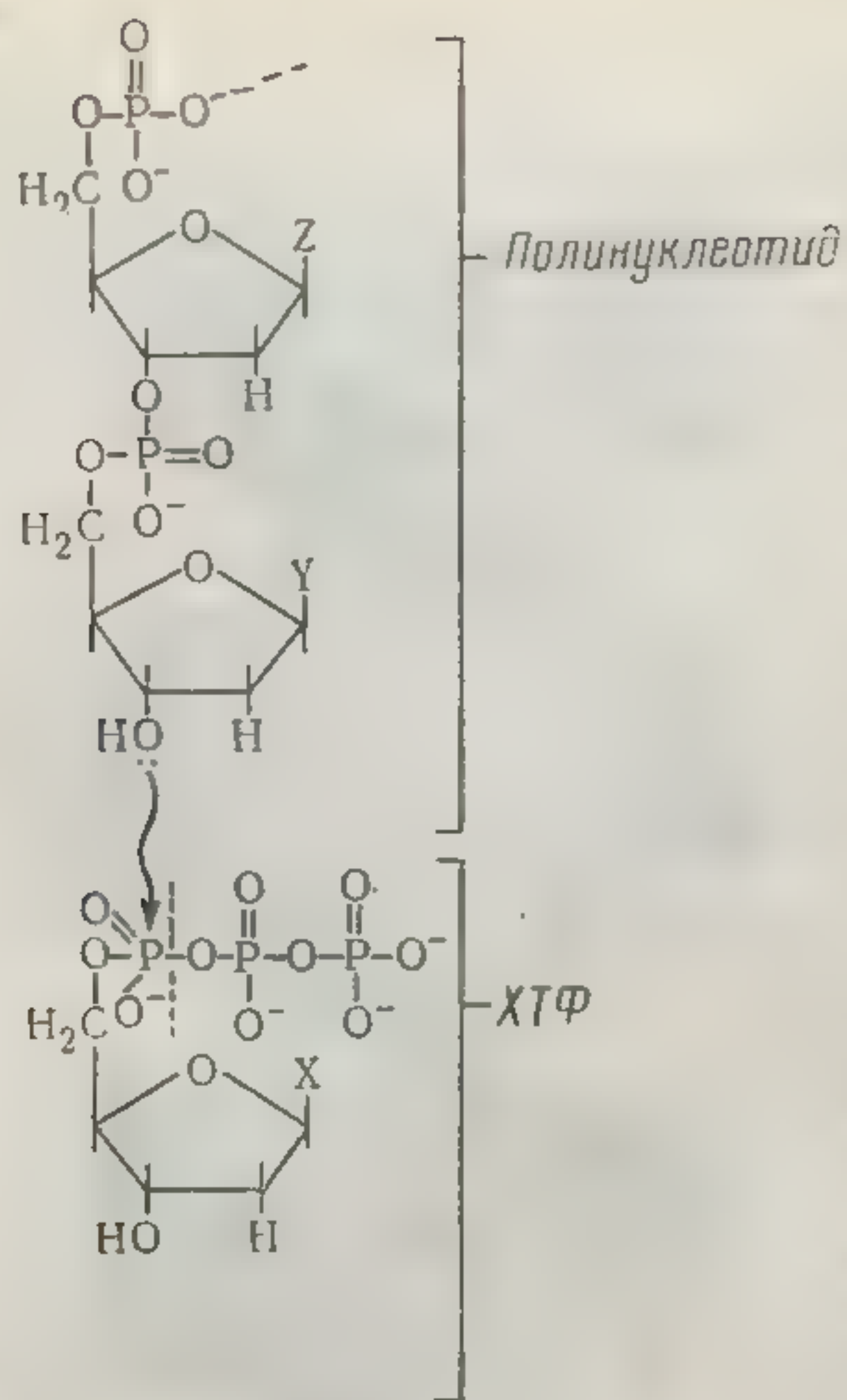


РИС. V-5.

Предполагаемый механизм удлинения цепочки ДНК

ляется неорганический пирофосфат и цепочка удлиняется на одну единицу. Результаты, полученные нами при исследовании синтеза ДНК, как будет показано ниже, согласуются с таким типом реакции.

СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА, СИНТЕЗИРУЮЩЕГО ДНК

Рассмотрим в первую очередь фермент, который, по-видимому, осуществляет синтез ДНК, и путь, который привел к его открытию [8, 11]. Трудно было ожидать, что смешивание трифосфатов четырех дезоксинуклеозидов, которые обычно входят в состав ДНК, с экстрактом из зубной железы или костного мозга или из *Escherichia coli* приведет к реальному синтезу ДНК. Напротив, как и следовало ожидать, доминирующим процессом было разрушение ДНК экстрактами из таких тканей и клеток; нужно было прибегнуть к более хитроумным приемам, чтобы влиять интересующую нас биосинтетическую реакцию. Мы использовали для этого меченный C^{14} субстрат, обладающий высокой удельной радиоактивностью, и инкубировали его с аденозинтрифосфатом и экстрактом из *Escherichia coli* — организма, который воспроизводится каждые 20 мин. Первый положительный результат состоял в том, что очень небольшая часть кислоторастворимого субстрата превращалась в кислотонерастворимую фракцию (в осадке обнаруживали около 50 импульсов из 1 000 000 импульсов добавленного субстрата). Хотя это и составляло всего несколько микромолей, все же это уже было нечто реальное. В эту крошечную щель мы попытались забить клин; молотом, который мы использовали для этого, явилась очистка фермента [12].

Этим приемом мы пользовались и раньше и пользуемся им с успехом до сих пор. Наши лучшие препараты в пересчете на белок в несколько тысяч раз обогащены ферментом по сравнению с неочищенными экстрактами; но они все еще загрязнены некоторым количеством одного или

трифосфата (АТФ) с никотинамидмононуклеотидом образуется дифосфопиридиннуклеотид, с рибофлавинфосфатом — флавинадениндинуклеотид (ФАД), с пантотеинфосфатом — предшественник кофермента А и т. д. Затем были открыты идентичные механизмы активирования жирных кислот и аминокислот, а также показано, что уридиновые, цитидиновые и гуанозиновые коферменты образуются аналогичным образом из соответствующих трифосфатов этих нуклеозидов.

Указанный механизм (рис. 4), в котором нуклеофильное воздействие [10] нуклеозидмонофосфата на активированную пирофосфатную группировку адеинового соединения приводит к образованию кофермента, был принят в качестве рабочей гипотезы для изучения синтеза цепочки ДНК. Как показывает рис. 5, мы предположили, что основной строительной единицей служит дезоксинуклеозид-5'-трифосфат, с которым взаимодействует 3'-гидроксильная группа растущего конца полидезоксинуклеотидной цепочки; при этом отщеп-

нескольких видов нуклеаз и диэстераз, которыми столь богаты клетки *E. coli*. В животных клетках и в клетках других видов бактерий установлено присутствие ферментных систем, которые, по-видимому, аналогичны системе, синтезирующей ДНК у *E. coli* [13]. Однако чтобы можно было сравнивать эти системы с системой *E. coli*, необходимо осуществить очистку ферментов, получаемых из этих источников.

На рис. 6 приведено уравнение, из которого видно, какие ингредиенты требуются для того, чтобы очищенная ферментная система из *E. coli* [14] могла осуществлять реальный синтез ДНК. Необходимым условием является присутствие всех четырех дезоксинуклеотидов, образующих пары аденин — тимин и гуанин — цитозин. Субстратами должны быть три-, а не дифосфаты; активностью обладают лишь соединения, содержащие дезоксисахара. ДНК, которая также должна присутствовать в реакционной смеси, может быть выделена из животных, растительных или бактериальных источников, а также из вирусов; лучшим подтверждением этому служит тот факт, что все эти препараты ДНК одинаково хорошо обеспечивают синтез ДНК при том условии, если их молекулярный вес достаточно высок. Продукт реакции, который мы рассмотрим подробнее несколько ниже, накапливается до тех пор, пока один из субстратов не будет исчерпан; количество образующегося продукта может в 20 раз и более превышать количество добавленной ДНК; таким образом, продукт реакции может на 95% и более состоять из субстратов, добавленных к реакционной смеси. В процессе реакции наблюдается освобождение неорганического пирофосфата в количестве, эквивалентном количеству дезоксинуклеотидов, превратившихся в ДНК.

Если один из субстратов отсутствует, то размеры синтеза уменьшаются более чем в 10^4 раз и обнаружить его в этом случае можно только при помощи специальных методов. При отсутствии одного из дезоксинуклеотидов к ДНК-затравке присоединяется чрезвычайно маленькое, но все же ощутимое количество нуклеотида. Мы описали эту «лимитированную» реакцию [15] и показали, что при таких условиях к нуклеозидному концу некоторых цепочек ДНК присоединяется небольшое количество дезоксинуклеотидов, но дальнейший синтез блокируется ввиду отсутствия соответствующего нуклеотида. Наши текущие исследования показывают, что подобная лимитированная реакция представляет собой наращивание

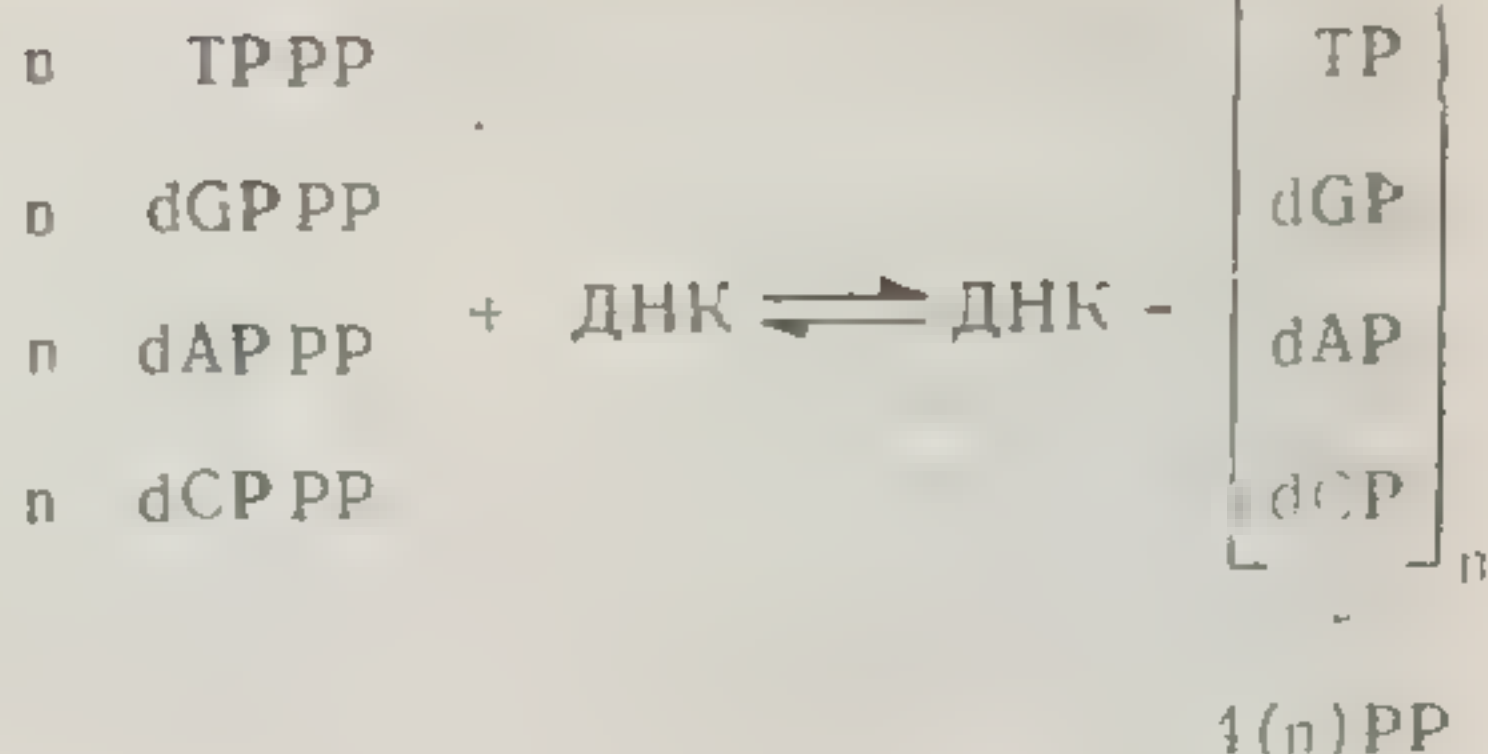


РИС. V-6.

Уравнение ферментативного синтеза ДНК. TPPP (ТФФФ) — трифосфат тимидина; dGPPP (дГФФФ) и т. д. — трифосфаты дезоксигуанозина и т. д.

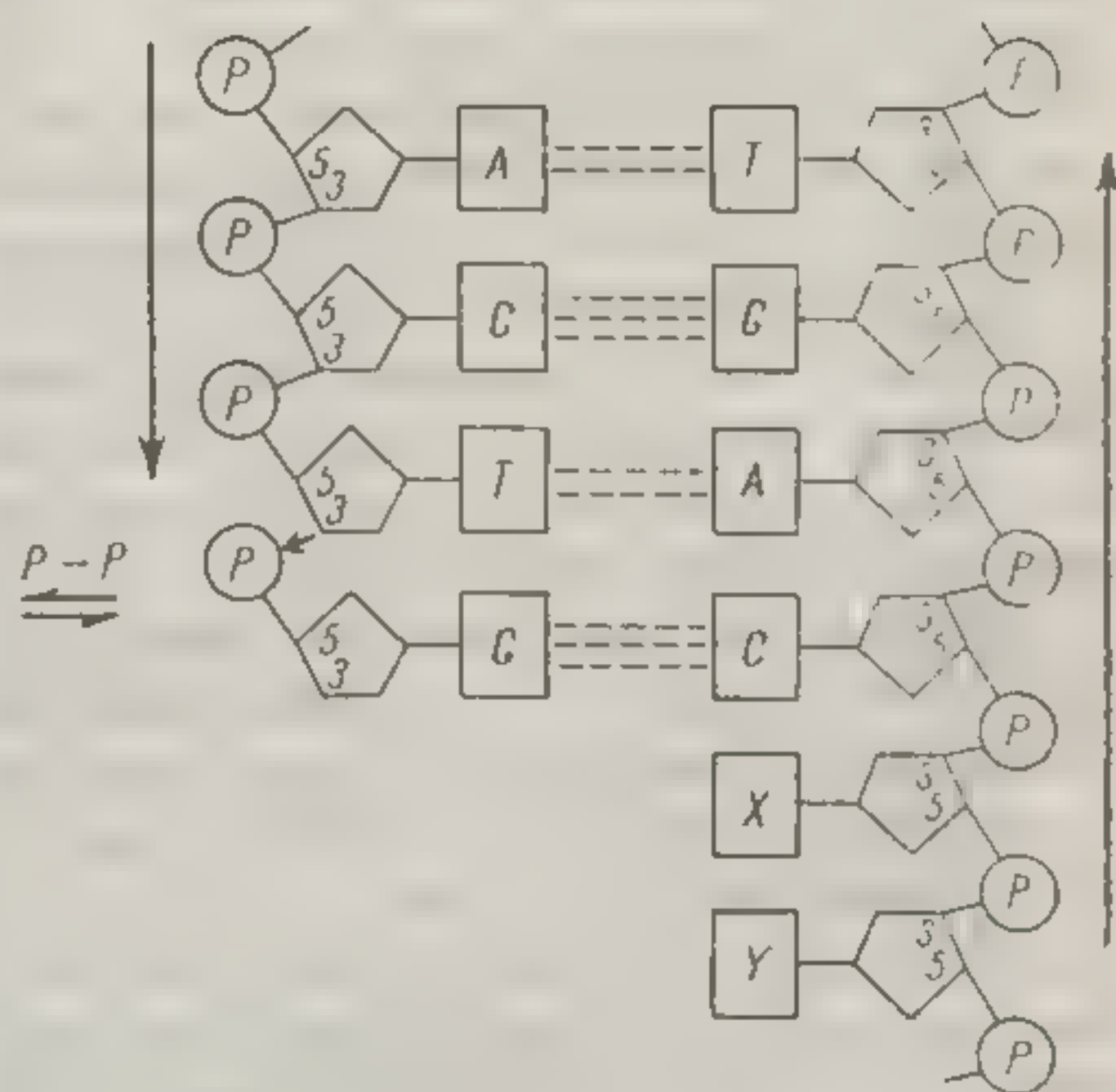


РИС. V-7.

Механизм ферментативного воспроизведения ДНК

более коротких двойных спиралей ДНК, в которых отдельные цепи обладают неодинаковой длиной, и что в основе реакции лежит образование водородных связей между аденином и тиминном, с одной стороны, и гуанином и цитозином — с другой.

Если присутствуют все четыре трифосфата, но отсутствует ДНК, то реакция не идет совсем. Чем обусловлена потребность в ДНК? Действует ли ДНК в качестве затравки, подобно гликогену, или она служит матрицей, управляющей синтезом точной копии самой себя? У нас имеются веские основания считать, что справедливо последнее предположение; поэтому я хотел бы в качестве центрального тезиса подчеркнуть, что потребность в ДНК определяется способностью оснований соединяться попарно водородными связями, причем водородные связи образуются между предшествующей ДНК и нуклеотидами, добавленными к реакционной среде в качестве субстратов.

Таким образом, изучаемый нами фермент уникален, насколько мы знаем в настоящее время, в том отношении, что он «получает указания» от матрицы: он катализирует образование водородных связей между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, добавленными в качестве субстратов, с одной стороны, и соответствующими основаниями матрицы — с другой (рис. 7). Это положение подтверждается данными пяти различных категорий.

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК, СИНТЕЗИРОВАННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ПУТЕМ

Данные первой категории были получены при исследовании физических свойств ДНК, образуемой изучаемым ферментом. Напомним еще раз, что в этом разделе, как и в разделе, посвященном химической природе ДНК (см. ниже), речь идет о препаратах ДНК, на 90—95 % состоящих из субстратов, добавленных в реакционную смесь. Наши совместные работы с Г. Шахманом показали, что продукт ферментативной реакции неотличим от высокомолекулярной двухцепочечной ДНК, выделенной из естественных источников [16]. Величины константы седиментации и приведенной вязкости позволяют считать, что синтезированная ферментативным путем ДНК представляет собой длинную жесткую палочку с молекулярным весом, равным приблизительно 6 млн. При нагревании ДНК палочкообразная структура разрушается, и молекула превращается в компактный беспорядочно свернутый клубок. Очевидно, водородные связи, соединяющие друг с другом цепочки в молекуле ДНК, разрушаются и это проявляется в характерных изменениях вискозиметрических и оптических свойств молекулы. Аналогичные результаты получаются при расщеплении молекулы ДНК дезоксирибонуклеазой поджелудочной железы. Во всех этих отношениях ДНК, синтезированная ферментативным путем, неотличима от ДНК, выделенной из естественных источников; поэтому можно считать, что она имеет структуру, аналогичную структуре естественной ДНК с характерными водородными связями.

Можно ли было думать, что деформированные нагреванием препараты ДНК с беспорядочно расположенными цепочками могут служить затравкой для синтеза ДНК? Считалось, что это скорее всего невозможно и что спутанная в клубок ДНК не способна служить матрицей в процессе воспроизведения. Однако оказалось, что разрушенная теплом молекула ДНК является превосходной затравкой для синтеза ДНК и что невязкая, беспорядочно свернутая одноцепочечная ДНК вызывает синтез двухцепочечной ДНК, обладающей высокой вязкостью [17]. Синсгеймер выделил из мельчайшего вируса фХ174 ДНК, которая, по-видимому, имеет одну цепочку [18]. Подобно нагретой ДНК, она оказалась превосходной затравкой [17] и очень полезным на данном этапе объектом для иссле-

дования [19]; именно на ней было показано по седиментации в градиенте плотности постепенное превращение одноцепочечной структуры в двухцепочечную в ходе ферментативного синтеза.

Мы не имеем возможности обсуждать здесь подробно физический аспект процесса воспроизведения; но следует отметить, что одноцепочечная ДНК является не только прекрасной затравкой, но представляет собой ту единственную форму ДНК, которая обладает активностью в случае наиболее очищенных препаратов ферментов. Нативная двухцепочечная ДНК, полученная из *E. coli*, инертна, пока ее предварительно не прогреют или не обработают осторожно дезоксирибонуклеазой. Боллум [20] сообщил об аналогичных наблюдениях, сделанных им на ферменте, полученном в очищенном виде из зубной железы телят.

ЗАМЕНА АЗОТИСТЫХ ОСНОВАНИЙ ИХ АНАЛОГАМИ ПРИ СИНТЕЗЕ ДНК

Данные второй категории были получены при исследовании активности таких субстратов, в пуриновых или пиримидиновых кольцах которых были произведены замещения. На основании многих сообщений о включении бромурацила [21], азагуанина [22] и других аналогов в ДНК бактерий и вирусов можно предположить, что в строении оснований допустимы определенные отклонения, если только они не влияют на процесс образования водородных связей. Опыты, проведенные с дезоксиуридинтрифосфатом или 5-бромдезоксиуридинтрифосфатом, показали, что эти соединения обеспечивают синтез ДНК, если они применяются вместо тимидинтрифосфата, но не обеспечивают его, если ими заменяют трифосфаты дезоксиаденозина, дезоксигуанозина или дезоксицитидина. Как уже сообщалось [23], 5-метил- и 5-бромцитозин обладают специфической способностью заменять цитозин; гипоксантин может заменять только гуанин; и, как уже указывалось, урацил и 5-бромурацил специфически заменяют тимин. Эти данные легче всего объяснить исходя из возможности образования водородных связей типа аденин — тимин и гуанин — цитозин.

В связи с этим уместно будет упомянуть о том, что существует естественный «аналог» цитозина, а именно оксиметилцитозин, который присутствует вместо цитозина в ДНК Т-четных фагов *E. coli* [24]. В этом случае ДНК содержит эквивалентное количество оксиметилцитозина и гуанина и, как обычно, эквивалентные количества аденина и тимина. Особый интерес представляет то обстоятельство, что ДНК бактериофагов Т2, Т4 и Т6 содержит глюкозу, связанную с оксиметильной группой оксиметилцитозина в характерных соотношениях [25, 26]; правда, у фагов Т2 и Т6 некоторые из оксиметильных групп не содержат глюкозы [26].

В связи с этим возникают две проблемы, касающиеся синтеза ДНК, которые на первый взгляд кажутся несовместимыми с простой гипотезой спаривания оснований. Во-первых, каков тот механизм, который в клетке, содержащей при нормальных условиях дезоксицитидинтрифосфат и включающей его в ДНК, препятствует включению в молекулу ДНК цитозина? Во-вторых, чем могло бы объясняться постоянство отношения глюкозы к оксиметилцитозину в молекуле ДНК, если включаются как связанные, так и не связанные с глюкозой оксиметилцитозиновые нуклеотиды?

Проведенные нами в последнее время опыты показали, что полимеразная реакция в клетках, инфицированных вирусом, подчиняется обычным законам образования водородных связей, но к этому присоединяется действие некоторых новых ферментов, образующихся в клетке специфически в ответ на инфекцию данным вирусом [27, 28]. Один из вновь образовавшихся ферментов расщепляет дезоксицитидинтрифосфат и таким образом удаляет его из сферы действия полимеразы [28]. Другой фер-

мент относится к типу гликозидирующих ферментов и переносит глюкозу с уридиндифосфатглюкозы непосредственно и специфически на некоторые остатки оксиметилцитозина в молекуле ДНК [28].

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭНЗИМАТИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОЙ ДНК

Данные третьей категории были получены при анализе пуриновых и пиримидиновых оснований, входящих в состав ДНК, синтезированной ферментативным путем. Перед нами встают два вопроса. Во-первых, сохраняется ли в этом продукте эквивалентность аденина и тимина, а также гуанина и цитозина, характерная для естественной ДНК? Во-вторых, влияет ли состав естественной ДНК, использованной в качестве затравки, на состав синтезируемого продукта? В табл. 1 приведены результаты, дающие ответ на эти два вопроса [29]. Все опыты проводились совершенно одинаково, за исключением того, что в каждом случае использовались разные ДНК-затравки, а именно ДНК из *Mycobacterium phlei*, из *Escherichia coli*, из зобной железы теленка и из фага Т2.

Таблица V-1

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДНК, СИНТЕЗИРОВАННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ПУТЕМ
В ПРИСУТСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАТРАВОК

| ДНК | Аденин (А) | Тимин (Т) | Гуанин (Г) | Цитозин (Ц) | $\frac{A+G}{T+C}$ | $\frac{A+T}{G+C}$ |
|----------------------------|---------------|--------------|---------------|----------------|-------------------|-------------------|
| <i>Mycobacterium phlei</i> | | | | | | |
| Затравка | 0,65 | 0,66 | 1,35 | 1,34 | 1,01 | 0,49 |
| Продукт реакции | 0,66 | 0,65 | 1,34 | 1,37 | 0,99 | 0,48 |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | | | |
| Затравка | 1,00 | 0,97 | 0,98 | 1,05 | 0,98 | 0,97 |
| Продукт реакции | 1,04 | 1,00 | 0,97 | 0,98 | 1,01 | 1,02 |
| Зобная железа теленка | | | | | | |
| Затравка | 1,14 | 1,05 | 0,90 | 0,85 | 1,05 | 1,25 |
| Продукт реакции | 1,12 | 1,08 | 0,85 | 0,85 | 1,02 | 1,29 |
| Бактериофаг Т2 | | | | | | |
| Затравка | 1,31 | 1,32 | 0,67 | 0,70 | 0,98 | 1,92 |
| Продукт реакции | 1,33 | 1,29 | 0,69 | 0,70 | 1,02 | 1,90 |
| АТ-кополимер | 1,99 | 1,93 | 0,05 | 0,05 | 1,03 | 40 |

Что касается первого вопроса, то, как видно из данных табл. 1, в ДНК, синтезированной ферментативным путем, количество аденина эквивалентно количеству тимина, а количество гуанина — количеству цитозина, так что содержание пуринов во всех случаях равно содержанию пиримидинов. Относительно второго вопроса можно сказать, что отношение числа пар аденин — тимин к числу пар гуанин — цитозин, характерное для ДНК-затравки, точно определяет характер синтезируемого продукта. Увеличивается ли общее количество ДНК лишь на 1% (по данным с изотопными маркерами) или на 100%, результаты получаются те же.

Далее следует отметить, что нарушить эти отношения путем изменения молярных концентраций добавляемых субстратов или каким-либо другим способом не удалось. В конце табл. 1 приведены данные по новой ДНК, синтезированной при условиях, которые я здесь не буду описывать [17, 30]. Достаточно сказать, что после очень длительного индукционного периода образуется кополимер дезоксиаденилата и тимидилата (АТ-кополимер), физические размеры и свойства которого аналогичны свойствами размерам ДНК; для образующегося полимера характерно отчетливо выраженное чередование аденина и тимина. Если эту редкую форму

ДНК-подобного полимера использовать в качестве затравки, то немедленно начинается синтез нового АТ-полимера, причем даже в том случае, если присутствуют все 4 трифосфата, в продукте реакции не удастся обнаружить хотя бы следов гуанина или цитозина. Таким образом, мы приходим к совершенно несомненному выводу, что при ферментативном синтезе воспроизводится состав оснований и что ведущим механизмом при этом служит образование водородных связей между аденином и тимином, с одной стороны, и гуанином и цитозином — с другой.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ НУКЛЕОТИДОВ

Данные четвертой категории, которые я хочу здесь привести, получены при изучении чередования оснований в ДНК и при изучении процесса воспроизведения этого чередования. Как я уже говорил, мы предполагаем, что ДНК представляет собой генетический код: четыре вида нуклеотидов образуют алфавит, состоящий из четырех букв, последовательность которых несет в себе определенную информацию. В настоящее время эта последовательность нам неизвестна; то, что Сангер сделал в отношении последовательности пептидов в белках, нужно еще сделать в области нуклеиновых кислот. Это более сложная проблема, но разрешить ее можно.

Попытки, предпринятые нами для определения порядка чередования нуклеотидов [31], мы опишем в другом месте, а здесь я хочу лишь кратко резюмировать эти опыты. ДНК синтезируют ферментативным путем, причем в качестве метки используют P^{32} , включенный в один из дезокси-нуклеозидтрифосфатов; остальные три субстрата метки не содержат. Радиоактивный фосфор, присоединенный к пятому углеродному атому дезоксирибозы, после реакции образует мост между молекулой субстрата и нуклеотидом у растущего конца цепочки, с которым он вступил в реакцию (рис. 8). По окончании реакции синтеза (после того, как образовалось около 10^{16} диэфирных связей) ДНК выделяют и разрушают ферментативным путем для количественного выделения 3'-дезоксинуклеотидов. Из рис. 8 видно, что атомы фосфора, присоединенные первоначально к пятому углеродному атому дезоксинуклеозидтрифосфата-субстрата, теперь оказываются присоединенными к третьему углероду нуклеотида, с которым он вступил в реакцию в ходе синтеза цепочки ДНК. Содержание P^{32} в каждом из 3'-дезоксинуклеотидов, выделенных методом электрофореза на бумаге, служит показателем относительной частоты, с которой соответствующий субстрат реагирует в процессе синтеза цепочки ДНК с каждым из четырех нуклеотидов, присутствующих в реакционной смеси. Подобный опыт, проведенный 4 раза, каждый раз с другим меченым нуклеозидтрифосфатом, дает представление об относительной частоте всех 16 возможных видов чередования динуклеотидов (ближайший сосед).

До настоящего времени такие исследования были проведены с пробами ДНК-затравки, полученными из шести различных естественных источников. Из этих опытов можно сделать следующие

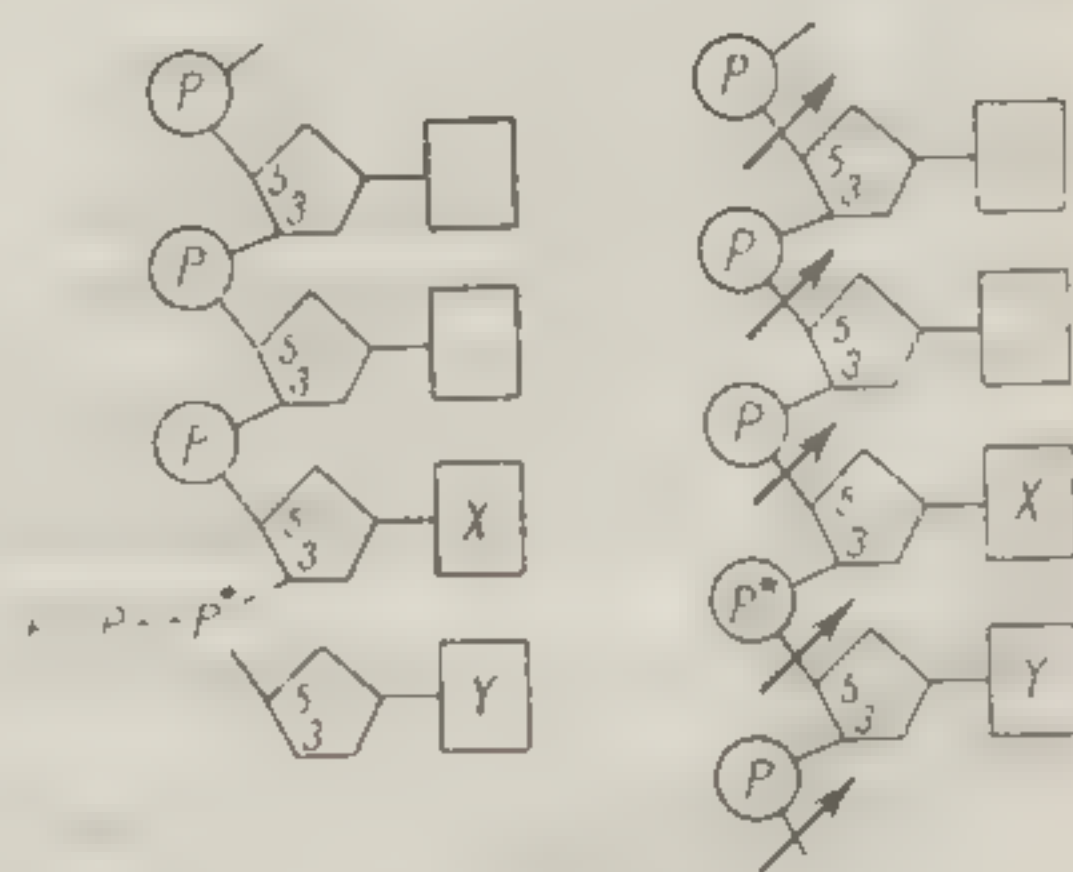


РИС. V-8.

Метод определения последовательности чередования нуклеотидов в ДНК. Слева — синтез (катализируется полимеразой); справа — распад (катализируется дезоксирибонуклеазой микрококков и диэстеразой селезенки)

щие выводы: 1) во всех случаях обнаруживаются все 16 возможных чередований динуклеотидов; 2) относительная частота их повторяемости характерна для каждого вида ДНК и воспроизводится от опыта к опыту; исходя из состава оснований ДНК ее предсказать нельзя; 3) ферментативное воспроизведение ДНК заключается в попарном соединении аденина с тиминном и гуанина с цитозинном и, что самое важное, 4) частота повторяемости ясно указывает на то, что при ферментативном воспроизведении ДНК образуются две цепочки, имеющие противоположное направление, как и следовало ожидать на основании модели Уотсона и Крика.

Дальнейшие исследования такого рода должны привести к определению частоты повторяемости динуклеотидов в любой пробе ДНК, которая может служить эффективной затравкой для ферментативного воспроизведения; таким путем мы сможем получить ключ к расшифровке кода ДНК. К сожалению, этот метод не дает сведений о повторяемости тринуклеотидов, но мы надеемся, что по мере усовершенствования ферментативных методов анализа и методов хроматографического выделения веществ в этом направлении будут достигнуты определенные успехи.

ПОТРЕБНОСТЬ В ЧЕТЫРЕХ ТРИФОСФАТАХ И ДНК-ЗАТРАВКЕ ДЛЯ СИНТЕЗА ДНК

Возвращаясь к упоминавшейся нами выше необходимости присутствия всех четырех нуклеотидов и ДНК-затравки для процесса синтеза ДНК, мы можем теперь рассматривать это обстоятельство как еще одно и последнее доказательство образования водородных связей. Без добавленной извне ДНК нет матрицы, на которой могли бы образовываться водородные связи; а в этом случае, если все четыре трифосфата не присутствуют одновременно, синтез быстро и резко останавливается из-за отсутствия пары, с которой то или иное основание матрицы могло бы соединиться водородными связями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Я схематически обрисовал энзимологический подход к проблеме воспроизведения ДНК и свойства синтезирующего ДНК фермента, выделенного в очищенном состоянии из *E. coli*. Основное и уникальное свойство этого фермента состоит в том, что он катализирует синтез новой цепочки ДНК в ответ на команду, получаемую им от ДНК-матрицы; эта команда определяется взаимоотношениями между аденином и тиминном, с одной стороны, и гуанином и цитозинном — с другой, и возможностью образования между ними водородных связей. Подтверждением подобного рода вывода служат следующие экспериментальные данные:

1) наличие в молекуле ДНК, синтезированной ферментативным путем, двух цепочек и образование двойной спирали из одноцепочечной молекулы;

2) результаты, получающиеся при замещении естественных оснований аналогами;

3) воспроизведение химического состава;

4) воспроизведение последовательности динуклеотидов (ближайший сосед) и антипараллельное направление цепочек в молекуле ДНК;

5) результаты, согласно которым обязательным условием для синтеза ДНК является присутствие ДНК-затравки и всех четырех дезоксирибозидтрифосфатов (аденина, тимина, гуанина и цитозина) [32].

Л И Т Е

1. O. ...
2. A. ...
3. G. ...
1957
1960
4. E. ...
p. 3
5. J. ...
6. M. ...
7. M. ...
8. A. ...
B. ...
след
9. A. ...
(Ed)
10. D. ...
B. ...
11. A. ...
12. A. ...
13. I. R. ...
233,
14. F. J. ...
15. M. J. ...
233,
16. J. A. ...
44,
17. H. K. ...
18. I. R. ...
19. R. L. ...
20. I. R. ...
21. F. J. ...
22. F. W. ...
23. M. J. ...
1952
24. M. J. ...
44,
25. G. R. ...
26. R. L. ...
27. R. L. ...
28. G. S. ...
29. J. G. ...
30. A. K. ...
Sci.
31. I. R. ...
44,
32. C. M. ...
33. J. J. ...

ЛИТЕРАТУРА

1. O. T. Avery, C. M. MacLeod and M. McCarty. J. Exptl. Med., 1944, 79, 137.
2. A. D. Hershey. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1953, 18, 135.
3. G. W. Beadle. In «Chemical Basis of Heredity», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). 1957, p. 3. (Дж. Бидл. В кн. «Химические основы наследственности». М., ИЛ, 1960).
4. E. Chargaff. In: «Nucleic Acids». E. Chargaff and J. N. Davidson (Eds). 1955, p. 307 — 371. (Э. Чаргаф. В кн. «Нуклеиновые кислоты» М., ИЛ, 1960).
5. J. D. Watson and F. H. C. Crick. Nature, 1953, 171, 737.
6. M. H. F. Wilkins. Biochem. Soc. Symposia (Cambridge, England), 1957, 14, 13.
7. M. Feughelman, R. Langridge, W. E. Seeds a. oth. Nature, 1955, 175, 834.
8. A. Kornberg. In: «The Chemical Basis of Heredity», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). 1957, p. 579. (А. Корнберг. В кн. «Химические основы наследственности». М., ИЛ, 1960).
9. A. Kornberg. In «Phosphorus Metabolism», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). 1951, p. 392.
10. D. E. Koshland, Jr. In: «The Mechanism of Enzyme Action», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). 1954, p. 608.
11. A. Kornberg, I. R. Lehman and E. S. Simms. Fed. Proc., 1956, 15, 291.
12. A. Kornberg. Harvey Lectures, 1957, 53, 83.
13. I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms and A. Kornberg. J. Biol. Chem., 1958, 233, 163.
14. F. J. Bollum and V. R. Potter. J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3603.
15. M. J. Bessman, I. R. Lehman, E. S. Simms and A. Kornberg. J. Biol. Chem., 1958, 233, 171.
16. J. Adler, I. R. Lehman, M. J. Bessman a. oth. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 1958, 44, 641.
17. H. K. Schachman, I. R. Lehman, M. J. Bessman a. oth. Fed. Proc., 1958, 17, 304.
18. I. R. Lehman. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 81, 745.
19. R. L. Sinsheimer. J. Mol. Biol., 1959, 1, 43.
20. I. R. Lehman, R. L. Sinsheimer and A. Kornberg. Неопубликованные данные.
21. F. J. Bollum. J. Biol. Chem., 1959, 234, 2733.
22. F. Weygand, A. Wacker and Z. Dellweg. Z. Naturforsch., 1952, 7, 19.
23. M. R. Heinrich, V. C. Dewey, R. E. Parks, Jr. and G. W. Kidder. J. Biol. Chem., 1952, 197, 199.
24. M. J. Bessman, I. R. Lehman, J. Adler a. oth. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1958, 44, 633.
25. G. R. Wyatt and S. S. Cohen. Biochem. J., 1953, 55, 774.
26. R. L. Sinsheimer. Science, 1954, 120, 551.
27. R. L. Sinsheimer. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1956, 42, 502.
28. G. Streisinger and J. Weigle. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1956, 42, 504.
29. J. G. Flaks and S. S. Cohen. J. Biol. Chem., 1959, 234, 1501.
30. A. Kornberg, S. B. Zimmerman, S. R. Kornberg and J. Josse. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1959, 45, 772.
31. I. R. Lehman, S. B. Zimmerman, J. Adler a. oth. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1958, 44, 1191.
32. C. M. Radding, J. Adler and H. K. Schachman. Fed. Proc., 1960 19, 307.
33. J. Josse and A. Kornberg. Fed. Proc., 1960, 19, 305.

Приложение VI

ГЕНЫ И ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У НЕЙРОСПОРЫ

ДЖОРДЖ В. БИДЛ

Нобелевская лекция, 1958 г.

Я удостоился высокой чести разделить Нобелевскую премию с Эдвардом Татумом за наше «...открытие того факта, что гены работают, регулируя химические реакции», и с Джошуа Ледербергом за его связанные с этим «...открытия, касающиеся организации генетического материала у бактерий». По этому случаю мне представляется уместным бегло обрисовать основные события, приведшие к работе с нейроспорой, которая была начата нами с Татумом в 1940 г. Задачу подробно изложить развитие работ с нейроспорой, последовавшее за нашим первым успехом, и описать их связь с подъемом бактериальной генетики, вызванном в значительной степени исследованиями генетической рекомбинации в результате конъюгации и трансдукции, я оставляю тем, с кем я разделил премию.

Я не буду пытаться дать обзор всей истории биохимической генетики, так как это уже сделано [2, 13, 22, 23].

АНТОЦИАНИНЫ И АЛКАПТОНУРИЯ

Вскоре после того, как де Фриз, Корренс и Чермак «повторно открыли» статью Менделя 1865 г. и оценили все ее значение, исследователи, работающие в новой развивающейся области, которая была названа генетикой, стали, естественно, делать предположения о физической природе «элементов» Менделя и о том, как они действуют. Вскоре было обнаружено, что эти единицы наследственности, получившие название генов, находятся в хромосомах.

Одна линия исследований, направленная на выяснение того, что же такое гены, была начата в 1903 г. Велдейлом (и позднее Онслоу). Началась она с генетического исследования окраски цветков львиного зева. Вскоре генетические наблюдения оказались связанными с химией антоцианина и родственных ему пигментов, вызывающих эту окраску. Материал был удобным как для генетических, так и для химических исследований, и работа продолжается с тех пор почти без перерыва, давая все новую и новую информацию. В этих исследованиях участвовали многие ученые и было использовано множество видов растений [2, 4, 13, 22, 23].

Очень скоро стало ясно, что здесь участвует много генов и что все они действуют, каким-то образом контролируя ход различных специфических химических реакций. Так как генетические знания помогли в интерпретации химических данных, и наоборот, то работы по антоцианину одинаково хорошо известны как генетикам, так и биохимикам. Это сильно повлияло на развитие взглядов в обеих областях и сыграло большую роль в дальнейших исследованиях.

Второе важное направление исследований было начато даже еще раньше оксфордским физико-химиком сэром Арчибальдом Гарродом. В самом начале века он заинтересовался группой наследственных болезней обмена у человека, которые он назвал позже «врожденными нарушениями обмена». Сейчас описано много таких болезней, и несомненно их следует причислить к категории заболеваний, имеющих большое значение для медицины.

Одной из первых врожденных болезней, изученных Гарродом, была алкаптонурия. Наиболее заметный ее симптом заключается в потемнении мочи на воздухе. Это заболевание было описано задолго до того, как им заинтересовался Гаррод и стали известны важные аспекты его биохимии. Потемнение мочи вызвано алкаптоном, или гомогентизиновой кислотой (2,5-диоксифенилуксусная кислота). Вначале Гаррод предполагал, что алкаптонурия передается по наследству, как если бы она определялась одним рецессивным геном.

К 1908 г. накопилось уже достаточно сведений об алкаптонурии. Эти сведения были собраны и проанализированы Гарродом в его Крунианских лекциях и в двух изданиях книги «Врожденные нарушения обмена» [11], написанной им по этим лекциям. Он полагал, что алкаптонурия вызвана тем, что больные не способны разорвать кольцо гомогентизиновой кислоты, как это делают здоровые люди. По его мнению, это являлось следствием отсутствия или неактивности фермента, который обычно катализирует эту реакцию, что, в свою очередь, было обусловлено отсутствием нормальной формы специального гена.

Таким образом, у Гаррода явно уже сложилась концепция о системе ген — фермент — химическая реакция, где все три составляющие связаны очень специфическим образом. В издании «Врожденных нарушений» 1923 г. [11] он писал:

«Далее мы можем себе представить, что расщепление бензольного кольца гомогентизиновой кислоты при нормальном обмене осуществляется специальным ферментом, и что при врожденной алкаптонурии этот фермент отсутствует...»

Следовательно, предложенное им объяснение основывалось на том, что неспособность преобразовывать промежуточное соединение в том случае, когда нормальный путь его обмена блокирован дефектом гена-фермента, вызывает накопление и выделение гомогентизиновой кислоты. Гаррод усматривал в этом метод определения промежуточного соединения, которое иначе могло бы и не появиться в количествах, достаточных для его обнаружения.

Он также явно понял, что нужно обследовать больных алкаптонурией, чтобы опытным путем изучить метаболические пути образования гомогентизиновой кислоты. Большое количество собранных им данных показывает, что при скормливания больным алкаптонурией обычных предшественников гомогентизиновой кислоты наблюдается явное увеличение ее выделения. Таким образом были получены данные о том, что почти непосредственными прямыми предшественниками гомогентизиновой кислоты являются фенилаланин, тирозин и его кето-кислотный аналог.

Несмотря на простоту и изящество объяснения Гарродом природы алкаптонурии и других врожденных нарушений обмена как дефектов генов, приводящих к инактивации специфических ферментов и вследствие этого вызывающих блокирование реакций, его работа оказала довольно мало влияния на мышление современных ему генетиков. Эти представления кратко разбираются в «Менделевских законах наследственности» Бэтсона и в немногих других книгах того времени. В учебниках генетики, которые были написаны до 1940-х годов и широко использовались и позднее, об алкаптонурии ничего не сказано. Правда, во многих других работах предполагалось, что гены могут действовать, регулируя химические реакции через посредство ферментов [2, 13, 17, 21, 23]. Но не было известно другого такого же простого примера, как алкаптонурия. Интересно, как мне кажется, знаменательно, что с тех пор, как Гаррод выдвинул свою гипотезу, и до того, как она была полностью подтверждена тем, что удалось разделить обмен фенилаланина и тирозина через гомогентизиновую кислоту на шесть катализируемых ферментами стадий и было четко доказано отсутствие гомогентизатоксидазы в печени больных

алкаптонурней, прошло около 50 лет [17]. Возможно, здесь уместно вспомнить, что первый фермент был выделен в кристаллическом виде только в 1926 г., и тогда-то и было убедительно показано, что он состоит лишь из белка.

ГЛАЗНЫЕ ПИГМЕНТЫ ДРОЗОФИЛЫ

Теперь я обращаюсь к другой линии исследований, закончившихся выводом, очень похожим на вывод, сделанный Гарродом; эта линия и привела непосредственно к работе с нейроспорой, начатой позднее Татумом и мной.

В 1933 г. в Калифорнийский технологический институт пришел, чтобы изучать генетику развития, Борис Эфрусс. Во время его пребывания там мы с ним часто и подолгу беседовали и не раз высказывали сожаление, что ничего не известно о том, как гены влияют на развитие. Мы приписывали это тому, что классические объекты, с которыми имеет дело экспериментальная эмбриология, мало пригодны для генетического исследования. И наоборот, те растения и животные, которые генетически изучены лучше всего, мало используются в эмбриологических исследованиях.

Мы считали, что стоит предпринять попытку исправить такое положение и попытаться поискать новые пути экспериментального изучения *Drosophila melanogaster*, организма, который в то время был изучен генетически лучше всех других. Казалось, что перспективной в этом отношении будет техника культуры ткани. Весной 1935 г. мы объединились в отделе Эфрусса в Институте физико-химической биологии в Париже, твердо настроенные на то, чтобы найти способы культивировать ткани личинок дрозофилы.

После нескольких безуспешных предварительных опытов мы последовали предложению Эфрусса и обратились к технике трансплантаций. Мы надеялись, что с ее помощью сможем использовать в качестве способа исследования действия генов при развитии неавтономные генетические признаки.

Личинки дрозофилы маленькие. И в разговоре с нами хорошо известный руководитель Сорбонны высказал мнение, что перспективы изучения развития двукрылых не блестящи. На самом деле он сказал даже, что они ужасны.

Но вернувшись в лабораторию, мы все-таки решили попытаться, сделали микропипетки, рассекли личинки и перенесли эмбриональные зачатки глаз из одной личинки в полость тела другой. Результаты были отрицательными. Однако мы упорно продолжали работать и наконец однажды обнаружили, что получили муху с тремя глазами. Хотя такой маленький успех и вызвал большую радость, нас сразу же стали мучить три вопроса: во-первых, сможем ли мы это воспроизвести? Во-вторых, если сможем, то окажемся ли в состоянии охарактеризовать способное диффундировать вещество, которое отвечает за взаимодействия между тканями разных генетических типов? И, в-третьих, сколько нам удастся найти неавтономных признаков?

Сначала мы изучали сцепленную с полом мутацию киноварного цвета глаз (vermillion), исходя из того, что еще раньше Стертевант обнаружил, что у гинандроморфов глаза, генетически являющиеся vermillion, часто не следуют общему закону автономности [20].

Гинандроморфы могут получиться, если эмбрион, начинающий свое развитие как самка из яйца с двумя X-хромосомами, во время раннего дробления утрачивает одну X-хромосому. Это приводит к появлению мужского сектора с одной X-хромосомой. Если исходное яйцо гетерозиготно по сцепленному с полом гену, например по гену vermillion, и если утраченная хромосома несет нормальный аллель, то мужской сектор окажется генетически vermillion, а женская часть особи будет нормаль-

ного или дикого типа. Для выявления генетической конституции большей части тела можно использовать в качестве маркеров другие сцепленные с полом признаки, например желтую окраску тела (yellow) или вильчатые щетинки (forked).

У гинандроморфов Стертеванта, у которых лишь небольшая часть тела, включая ткань глаза, была vermilion, этот глаз на вид был обычно дикого типа, а не vermilion — как если бы некое вещество диффундировало от тканей дикого типа к глазу и вызывало его нормальную окраску.

Основываясь на этом наблюдении, мы с Эфруси пересаживали глаза vermilion в личинки дикого типа. Результат получился такой, которого мы и ждали: пересаженные глаза действительно были дикого типа.

В то время у дрозофилы было известно 26 различных генов цвета глаз. Мы раздобыли все эти линии и провели серию трансплантаций мутантных глаз в хозяина дикого типа. Мы обнаружили лишь еще один, другой, явно отличающийся неавтономный признак цвета глаз. Это был cinnabar, ярко-красный цвет глаз, подобный vermilion, но определяющийся другим рецессивным хромосомным геном. У нас был также и третий менее ясный случай, рубиновый цвет (claret), но с экспериментальной точки зрения он никогда не был полностью удовлетворительным, так как в трансплантатах трудно отличить глаз claret от глаза дикого типа.

Признаки vermilion и cinnabar внешне сходны. В обоих случаях отсутствует бурый пигмент, имеющийся у мух дикого типа, но сохраняется ярко-красный пигмент. Вызывают ли появление бурого пигмента у таких трансплантатов при росте в хозяевах дикого типа одни и те же диффундирующие вещества или они различны? Если это одно и то же вещество, то реципрокные пересадки между двумя мутантами должны дать в обоих случаях пересаженные глаза мутантного типа. Если же здесь участвуют разные и независимые вещества, то такие реципрокные пересадки должны дать в обоих случаях пересаженные глаза дикого типа.

Мы провели такой эксперимент и были сильно озадачены, так как не получили ни того, ни другого. Глаз cinnabar в хозяине vermilion остался cinnabar, а глаз vermilion в хозяине cinnabar стал дикого типа.

Чтобы объяснить этот результат, мы выдвинули гипотезу, что здесь участвуют два диффундирующих вещества — одно, образующееся из другого в соответствии со схемой: \rightarrow предшественник \rightarrow вещество v^+ \rightarrow вещество sn^+ \rightarrow пигмент..., где вещество v^+ является диффундирующим соединением, способным превращать глаз vermilion в дикий тип, а вещество sn^+ способно делать то же самое с глазом cinnabar [9].

Мутантный ген vermilion (v) блокирует первую реакцию, а мутантный ген cinnabar (sn) прерывает вторую. Глаз vermilion в хозяине cinnabar образует пигмент потому, что он может в своей собственной ткани превращать вещество v^+ в вещество sn^+ и пигмент. В нем вторая реакция не блокирована.

Эта схема включает следующие представления:

- а) имеется последовательность двух управляемых генами химических реакций, с каждой из которых сопоставляется один ген;
- б) перед блокированной реакцией происходит накопление промежуточных соединений;

- в) мутант, у которого блокирована первая реакция, способен использовать промежуточное соединение, которое накапливается в результате генетического нарушения второй реакции. Здесь действует тот же принцип, что и в методе перекрестного кормления, который позднее так часто использовался для обнаружения промежуточных соединений биосинтеза у микроорганизмов.

В это время у нас уже сложилась та концепция, которая позднее была названа концепцией один ген — один фермент, хотя, насколько я помню, мы ее так не называли.

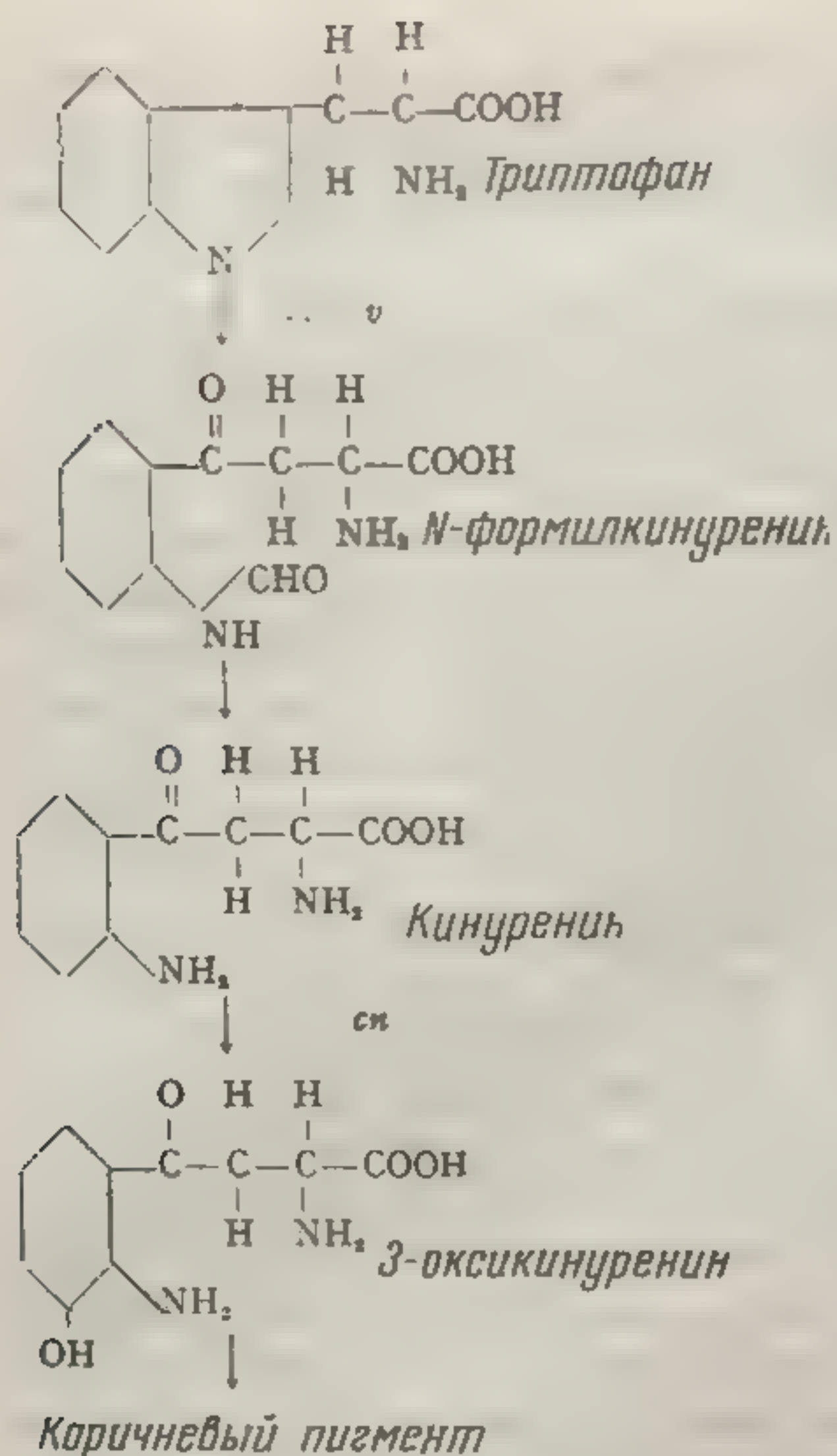


РИС. VI-1.

Биосинтез пигментов (см. текст)

ся Татум, который взял на себя химическое изучение веществ, окрашивающих глаза. С Эфрусси в той же роли работала д-р Ивонна Хувин. Прогресс вперед был очень медленным. Эфрусси и Хувин открыли, что при определенных условиях скормливание триптофана влияет на окраску глаз. Следуя этому примеру, Татум обнаружил — из-за случайного загрязнения стерильной культуры, содержащей триптофан и опытных мух — аэробных бактерий, которые превращали триптофан в соединение, очень активно индуцирующее образование бурого пигмента у мух *vermillion*. Он быстро его выделил и закристаллизовал, однако окончательная идентификация этого соединения замедлялась тем, что, как потом выяснилось, оно было связано с сахарозой.

В Германии профессор Бутенандт с сотрудниками [6], который вместе с Куном изучал аналогичных мутантов по цвету глаз у мучной огневки *Ephesia*, и Аmano и др. [1], работавшие в университете Осака, показали, что вещество v^+ представляет собой кинуренин. Позднее Бутенандт и Халлман [5] и Бутенандт и др. [7] установили, что вещество, исходно обозначенное нами как sn^+ — это 3-оксикинуренин.

Так была установлена последовательность реакций именно такого типа, как мы и представляли себе первоначально. Если подставить известные химические соединения, то эта цепь реакций будет выглядеть, как это показано на рис. 1.

НОВЫЙ ПОДХОД

Выделение предшественников глазного пигмента дрозофилы продвигалось медленно и было непривлекательным делом. Мы с Татумом понимали, что так, вероятно, и должно быть в большинстве случаев, когда пытаются анализировать химические нарушения, лежащие в основе

Наша схема была очень похожа на ту, которую предлагал Гаррод для алкаптонурии, за исключением лишь того, что у него не было генов, которые блокировали бы соседние реакции в цепи. Но в то время мы не знали о работах Гаррода, отчасти потому, что генетики не имели привычки на них ссылаться, а отчасти из-за того, что мы сами мало изучали литературу. Книга Гаррода имелась во многих библиотеках.

Исследование окраски глаз мы продолжили в Калифорнийском технологическом институте, куда Эфрусси вернулся провести часть 1936 г. Позднее, в том же году, Эфрусси вернулся в Париж, а я на год уехал в Гарвард, но мы оба продолжали работать в сходных направлениях. Мы определили источник диффундирующих веществ — жировые тела и мальпигиевы бугорки — и начали придумывать способы определения химической природы этих веществ. В этом отношении я сотрудничал в некоторой степени с профессором Кеннетом Тимэном.

Осенью 1937 г. я переехал в Стэнфорд, где вскоре ко мне присоединил-

врожд
выбра
удачн
долго
и изу
На

мута
Она л
мые ф
мость,
фично
находи
есть т
синтез
[18],
о возм
вывало
из нача
глаз.

Иде
щий пр
способе
образу
мутаген
мейоз и
де с до
перено
мально
из тех
серию с
установ

Мы
выше св
но был

НЕИРОС

Будучи
Йоркск
у хлеб
типов с
Некото
вого пе
хорошо
геном.

Дод
генетиче
он пере
В конце
им в 19
институ

Вско
ранта п
его дис
выбор,
азмом и
К. Брид
ми инсти

врожденных аномалий. Лишь по счастливой случайности какой-либо выбранный для исследования случай мог оказаться простым. Таким удачным случаем для Гаррода была алкаптонурия, так как ею в течение долгого времени занимались химики и за много лет до него была выделена и изучена гомогентизиновая кислота.

Наша идея была ясна — изменить процедуру и следить за генными мутациями, которые влияли бы на уже известные химические реакции. Она логически вытекала из той концепции, что, в общем, все катализируемые ферментами реакции находятся в зависимости от генов. Эта зависимость, как мы предполагали, состоит в том, что гены определяют специфичность ферментов. Несомненно, что при выработке этого подхода мы находились под влиянием работ Львова, показавшего, что у паразитов есть тенденция специализировать свой обмен и утрачивать способность синтезировать те вещества, которые они легко могут получить от хозяина [18], а также под влиянием предположений других исследователей о возможных механизмах действия генов. Но концепции, на которых основывался этот подход, развились у нас более или менее непосредственно из начатой нами с Эфрусси 5 годами раньше работы по изучению окраски глаз.

Идея была простая. Нужно выбрать организм вроде гриба, обладающий простыми потребностями в питании (это должно означать, что он способен осуществлять многочисленные реакции, в результате которых образуются аминокислоты и витамины), затем излучением или другими мутагенными агентами индуцировать мутации; допустить, чтобы прошел мейоз и образовались генетически гомогенные споры; вырастить их на среде с добавкой множества витаминов и аминокислот; наконец, испытать их, перенося на среду без добавок. Утратившие способность расти на минимальной среде утратили способность синтезировать одно или несколько из тех веществ, которые имеются в среде с добавками. Затем, проводя серию систематических испытаний на средах с частью добавок, можно легко установить потребность дефектного штамма в питательных веществах.

Мы хотели работать с организмом, который, кроме перечисленных выше свойств, был бы удобен и для генетических исследований. Желательно было бы, чтобы основы генетики этого организма уже были известны.

НЕЙРОСПОРА

Будучи аспирантом в Корнелле, я посещал семинар д-ра Б. Доджа из Нью-Йоркского ботанического сада, посвященный проблеме наследования у хлебной плесени, *Neurospora*. Для него было загадкой расщепление типов скрещиваемости и альбинизма при так называемом втором делении. Некоторые из нас, кто уже знал о существовании у дрозофилы 4-нитового перекреста, высказали предположение, что этот результат можно хорошо объяснить перекрестом между центромером и расщепляющимся геном.

Додж был восторженным приверженцем нейроспоры как объекта генетических исследований. «Она еще лучше дрозофилы», — настаивал он перед Томасом Х. Морганом, в лаборатории которого он часто бывал. В конце концов, он убедил Моргана взять с собой в новый, основанный им в 1928 г., биологический отдел Калифорнийского технологического института коллекцию культур нейроспоры из Колумбии.

Вскоре после этого, когда в лабораторию Моргана в качестве аспиранта пришел Карл Линдгрэн, было решено, что материалом для его диссертации послужит генетика нейроспоры. Это был удачный выбор, так как Линдгрэн обладал богатым воображением, энтузиазмом и энергией, и в то же время советовался с Э. Андерсоном, К. Бриджесом, С. Эмерсоном, А. Стертевантом и другими сотрудниками института, которые тогда глубоко интересовались перекрестом как

частью механизма мейоза. В этой благоприятной обстановке Линдгрэн быстро разработал основы генетики нейроспоры. Были найдены новые признаки и успешно начато картирование хромосом.

Поэтому мы с Татумом понимали, что в генетическом отношении нейроспора была почти идеальным организмом для задуманной нами работы.

Однако неизвестным оставался еще один очень важный вопрос. Мы ничего не знали о питательных потребностях плесени. Правда, имелась монография д-ра Нильса Фриза, из которой мы выяснили, что многие родственные нитчатые грибы обладают простыми потребностями в питании. Ободренные этим, мы достали у Линдгрена и у Доджа штаммы *Neurospora crassa*. Татум быстро обнаружил, что единственным необходимым фактором роста, кроме обычных неорганических солей и сахара, был открытый незадолго до того витамин, биотин. Годом раньше мы не могли бы использовать нейроспору для наших целей, так как биотин не был тогда еще доступен в необходимых нам количествах.

Оставалось только облучить вегетативные споры, скрестить их со штаммами противоположного типа скрещиваемости, отделить образовавшиеся половые споры, вырастить их на среде с соответствующими добавками и испытать на среде без добавок. Мы были уверены, что связь ген — фермент — реакция носит общий характер, и не сомневались в том, что желаемые мутанты будут найдены. Нас тревожило лишь то, что их частота может быть столь низка, что нам придется разочароваться и бросить работу раньше, чем мы отыщем хотя бы одного.

Нас так тревожили возможные разочарования от длинной серии опытов с отрицательными результатами, что прежде, чем провести их испытание, мы приготовили более тысячи отдельных споровых культур на среде с добавками. 229-я выделенная спора дала мутантный штамм, требующий витамин В₆, а 1085-я — штамм, требующий витамин В₁. Мы дали обет продолжать отбор, пока не наберем 10 мутантов. Скоро их число исчислялось уже десятками.

Так как у нейроспоры просто получить все продукты отдельного мейотического процесса, то легко было и определить, являлись ли полученные нами индуцированные нарушения в обмене результатом мутаций отдельных генов. В этом случае скрещивание с исходным типом должно было бы привести к появлению в споровой сумке четырех мутантных и четырех немутантных спор. Так оно и оказалось [3, 21].

Таким длинным, окольным путем, сначала на дрозофиле, а затем на нейроспоре, мы повторно открыли то, что Гаррод так ясно видел за много лет до нас. К этому времени мы уже знали о его работе и признавали, что если и добавили что-нибудь принципиально новое, то наш вклад весьма незначителен. Мы работали с более удобным организмом и имели возможность получать, почти по желанию, врожденные нарушения обмена почти для любой химической реакции, продукт которой мы могли добавить в среду. В результате нам удалось показать, что связь, установленная Гарродом для небольшого числа генов и химических реакций у человека, справедлива для многих генов и многих реакций у нейроспоры.

Осенью 1941 г. в Станфорд в качестве стипендиата Национального совета исследований приехал Френсис Дж. Райан, и очень быстро он полностью примкнул к работе с нейроспорой. Годом позже к группе присоединились Дэвид М. Боннер и Норман Г. Горовиц. Вскоре у нас появился и Гершель К. Митчелл. С участием большого числа способных аспирантов и группы увлеченных работой и опытных в экспериментировании ассистентов работа продвигалась удовлетворительно.

Возможность рассказать о направлениях наших последующих исследований и подвести итог их результатам я предоставляю профессору Татуму.

ОДИ
Гип
того
обла
чаях
тати
мул
же д
С
было
прио
мута
лиро
венн
обра
дило
тами
непп
обще
Се
нию
и тог
гивак
Я над
Мне
ведли
Бе
один
ровал
от Гар
Голди
19, 22
выше
Они су
тате с
Кр
жение
реакци
важны
соедин
как та
могут
ких не
Гор
реакци
в резу
рованы
и Юри
вполне
соедин
единич
довател
нался с
ного пр
щество
шего чи

ОДИН ГЕН — ОДИН ФЕРМЕНТ

Гипотеза один ген — один фермент заключается в том, что гены, кроме того, что они играют существенную роль в своей собственной репликации, обладают, в общем, лишь одной первичной функцией, и во многих случаях эта функция заключается в контроле над специфичностью ферментативно активных белков. Иногда думают, что эта гипотеза была сформулирована на основании результатов работы с нейроспорой. На самом же деле путь был другим — новый подход явно был вызван этой гипотезой.

Сходная концепция имела еще у нас с Эфрусси, хотя ее и нельзя было ясно сформулировать. Более определенную форму эта гипотеза приобрела после того, как стало очевидным, что из всех 26 известных мутаций цвета глаз у дрозофилы лишь одна блокировала первую из постулированных нами реакций и одна — вторую. Поэтому казалось естественным принять, что вся специфичность данного фермента должна каким-то образом определяться отдельным геном. Предсказываемое нами подтвердилось открытием того, что многие мутантные штаммы нейроспоры с дефектами в обмене можно починить, добавляя лишь одно химическое соединение, и это укрепило нашу веру в гипотезу, по крайней мере в ее более общей форме.

Сейчас известно много примеров, когда независимые по происхождению мутации снижают или полностью уничтожают активность одного и того же специфического фермента. Было показано, что все они затрагивают один небольшой сегмент генетического материала [8, 12, 24]. Я надеюсь, что профессор Татум подробно остановится на этих случаях. Мне кажется, что это дает убедительные доказательства в пользу справедливости гипотезы и в ее более ограниченной форме.

Безотносительно к тому, когда и в какой форме концепция один ген — один фермент была впервые изложена, сам я убежден, что она сформировалась в результате постепенной эволюции. Начало свое она ведет от Гаррода, ее развитию способствовали многие ученые, в том числе Мур, Голдшмидт, Троланд, Холдейн, Райт, Грюнберг и многие другие [2, 13, 19, 22, 23]. Горовиц с сотрудниками [15, 16] дали ее в обеих приведенных выше формах, в наиболее подробной и наиболее понятной формулировке. Они суммировали и критически оценили доводы за и против нее, и в результате остались убежденными в ее непреходящей ценности.

Кроме того, Горовиц сам применил эту гипотезу, выдвинув предположение о том, как могла возникнуть последовательность биосинтетических реакций [14]. Он указывает, что, как известно, многие биологически важные соединения синтезируются по этапам, причем промежуточные соединения, по-видимому, не могут быть использованы организмом как таковые. Как могли возникнуть такие пути синтеза, которые они могут использовать лишь целиком? Одновременное появление нескольких независимых ферментов должно быть, конечно, крайне маловероятным.

Горовиц предположил, что сначала конечный продукт такой серии реакций организм получал непосредственно из среды, где он возникал в результате биологических реакций типа тех, которые были постулированы разными учеными, в том числе Дарвином, Холдейном, Опарным и Юри, и которые были показаны Миллером, Фоксом и др. [10]. Поэтому вполне разумно предположить, что способность синтезировать такое соединение биологически могла возникнуть в результате серии отдельных единичных мутаций, каждая из которых добавляла в цепи синтеза последовательные стадии, катализируемые ферментами. Этот процесс начался с той стадии, которая непосредственно отвечает за появление конечного продукта. В этом случае каждая мутация могла бы давать преимущество при отборе, так как мутировавший организм зависит уже от меньшего числа экзогенных предшественников, необходимого конечного про-

дукта. Трудно представить себе, как могли бы возникнуть сложные пути синтеза, если бы не было какого-то такого механизма, с помощью которого для появления нового фермента нужна мутация лишь в одном гене. Я не знаю другой столь же простой и правдоподобной гипотезы.

МЕСТО ГЕНЕТИКИ В СОВРЕМЕННОЙ БИОЛОГИИ

В известном смысле генетика выросла сиротой. Вначале ботаники и зоологи были к ней часто равнодушны, а иногда и враждебны. Нередко говорили: «Генетика имеет дело лишь с внешними признаками». В ее детстве ей мало внимания уделяли также и биохимики. Они, особенно медицинские биохимики, знали о Гарроде, о врожденных нарушениях обмена и несомненно оценили их и с биохимической точки зрения, и как болезни. Но биологический мир был недостаточно подготовлен к тому, чтобы полностью оценить значение исследований Гаррода и его идей. Надо сказать, что и генетики стремились в основном заниматься механизмами передачи генетического материала от поколения к поколению.

К счастью, сейчас ситуация сильно изменилась. Генетика занимает прочное место в современной биологии. Биохимики признают генетический материал неотъемлемой частью изучаемых ими систем. Наши быстро развивающиеся познания об архитектуре белков и нуклеиновых кислот делают возможным — впервые в истории науки — обсуждение генетиками, биохимиками и биофизиками основных проблем биологии на общем языке молекулярной структуры. По моему мнению, это самое ободряющее и важное.

ЛИТЕРАТУРА

1. T. Amano, M. Torii and H. Iritani. Med. J. Osaka Univ., 1950, 2, 45.
2. G. W. Beadle. Chem. Rev., 1945, 37, 15.
3. G. W. Beadle and E. L. Tatum. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1941, 27, 499.
4. G. H. Beale. Genetics, 1941, 42, 196.
5. A. Butenandt and G. Hallmann. Z. Naturforsch., 1950, 5b, 444.
6. A. Butenandt, W. Weidel and E. Becker. Naturwiss., 1940, 28, 63.
7. A. Butenandt, W. Weidel and H. Schlossberger. Z. Naturforsch., 1949, 4b, 242.
8. M. Demerec, Z. Hartman, P. E. Hartman, T. Yura, J. S. Gots, H. Ozeki and S. W. Glover. Publication 612, Carnegie Inst. Wash., 1956.
9. B. Ephrussi. Quart. Rev. Biol., 1942, 17, 327.
10. S. W. Fox. Amer. Sci., 1956, 44, 347.
11. A. E. Carrod. Inborn Errors of Metabolism. Oxford Univ. Press, 1923.
12. N. H. Giles. Proc. X Internat. Cong. Genetics.
13. J. B. S. Haldane. The Biochemistry of Genetics. London, 1954.
14. N. H. Horowitz. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1945, 31, 153.
15. N. H. Horowitz and M. Fling. In: «Enzymes», O. H. Gaebler (Ed.), 1956. N. Y., p. 139.
16. N. H. Horowitz and U. Leopold. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1951, 16, p. 65.
17. W. E. Knox. Am. J. Human Genetics, 1958, 10, 95.
18. A. Lwoff. L'évolution physiologique. Paris, 1944.
19. H. J. Muller. Proc. Royal Soc., Ser. B, 1947, 134, 1.
20. A. H. Sturtevant. Proc. VI Internat. Congr. Genetics, 1932, v. 1, p. 304.
21. E. L. Tatum and G. W. Beadle. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1942, 28, 234.
22. R. P. Wagner and H. K. Mitchell. Genetics and Metabolism. N. Y., 1955.
23. S. Wright. Physiol. Rev., 1941, 21, 487.
24. C. Yanofsky. In: «Enzymes», O. H. Gaebler (Ed.), 1956. N. Y., p. 147.

Приложение VII

ИСТОРИЯ ОДНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Э. Л. ТАТУМ

Нобелевская лекция, 1958 г

Многие сведения из биохимической генетики уже были рассмотрены профессором Бидлом, о многом еще расскажет профессор Ледерберг. Различные ее аспекты обсуждались в большом количестве симпозиумов и обзоров подробнее и компетентнее, чем я могу надеяться сделать это здесь. Поэтому, когда я размышлял о теме лекции, мне пришла мысль, что возможно было бы поучительно, ценно и интересно осветить здесь подход, который я попытался озаглавить как «История одного биологического исследования». Излагая эту историю, я надеюсь указать на некоторые факторы, общие для всех исследований, обратив особое внимание на зависимость исследования от научного прогресса: от знаний и концепций, полученных усилиями как ученых прошлого, так и стараниями современных нам ученых всего мира; от свободного международного обмена идеями в научном мире; от гибридной силы, возникающей при перекрестном оплодотворении разных отраслей знаний; и наконец (последнее в порядке упоминания, но не по важности) от случая, географического положения и благоприятных возможностей. Наконец, мне хотелось бы закончить эту историю, кратко обсудив современное состояние рассматриваемой области и высказав кое-какие прогнозы относительно ее возможного развития.

Надеюсь, что при таких условиях мне простят, если мое изложение будет носить несколько личный характер. После окончания Висконсинского университета по специальности «химия» мне посчастливилось остаться в этом же университете и выполнять работу на ученую степень по биохимии и микробиологии под руководством В. Г. Петерсона и Э. Б. Фреда. В то время, в конце 30-х годов, были открыты так называемые «факторы роста» микроорганизмов, в большинстве еще таинственные и неопознанные. Я с головой погрузился в эту увлекательную область. И с головой погрузился тогда в Висконсине Г. Г. Вудом и нам вместе с временно находившимся тогда в Висконсине Г. Г. Вудом удалось отождествить один из необходимых факторов роста пропионовых кислых бактерий с синтезированным незадолго до того витамином B₁, или тиамин [1]. Это произошло еще до того, как была четко показана универсальность потребности в витаминах группы В и вскрыты ее причины. К тому времени Львов и Найт уже указали на корреляцию между потребностью микроорганизмов в «факторах роста» и нарушением процессов синтеза и связали это нарушение с эволюцией этих организмов. В частности, это касалось сложной среды «привередливых» патогенных микроорганизмов. Однако в то время «факторы роста» обычно относили к очень индивидуальным потребностям, свойственным только немногим определенным штаммам и видам микроорганизмов. Вариации потребностей микроорганизмов, как правило, не связывали с мутированием генов и с вариациями у высших форм. Присущие мне в то время невежество и наивность в генетике были, вероятно, типичны для большинства биохимиков и микробиологов. Ранее я соприкасался с генетическими представлениями лишь во вводном курсе эволюции позвоночных.

После окончания аспирантуры в Висконсине мне посчастливилось проучиться год в Утрехтском университете у Ф. Кёгля, который открыл еще один «фактор роста» — биотин, и работать там в одной лаборатории

с Нильсом Фризом, уже тогда много сделавшим в изучении питания и роста грибов.

В то время профессор Бидл только что перешел в Станфордский университет; он пригласил меня участвовать в качестве биохимика в продолжении изучения гормонов окраски глаз у дрозофилы. Ранее они с Эфрусси, работая в Калифорнийском технологическом институте и в Париже, блестяще доказали, что эти гормоны являются диффундирующими продуктами реакций, контролируемых генами. Во время этой работы я и столкнулся впервые с современными генетическими представлениями. Произошло это в силу разных причин: наблюдений, сделанных в Париже Хувин, Эфрусси и Шёве [2], которые обнаружили, что скормливание триптофана дрозофиле влияет на образование гормонов окраски глаз; наших исследований по питанию дрозофилы в стерильной культуре [3]; случайного загрязнения одной из наших культур дрозофил специфической бактерией. В результате этого мы смогли выделить в кристаллическом виде из бактериальной культуры, которой скормливали триптофан, гормон ν^+ [4] и вместе с А. Дж. Хаген-Смитом отождествить его с кинуренином [5], который впервые был выделен Котаке и структура которого позднее была установлена Бутенандтом. С тех пор признано центральное положение кинуренина в обмене триптофана у многих организмов, помимо насекомых, в том числе у млекопитающих и у грибов.

Примерно в то же время, после длительных дискуссий о возможности перенесения концепций химической генетики на всю биологию, побуждаемые богатством возможностей микроорганизмов и разнообразием их потребностей в питании, мы начали работать с плесенью *Neurospora crassa*.

Не буду перечислять все, что привело к выбору именно этого организма для получения мутантов с измененным питанием. Воспользуюсь случаем повторить, что мы многим обязаны здесь фундаментальным данным, полученным различными исследователями, и в первую очередь Б. О. Доджем, который установил, что этот аскомицет представляет собой наиболее удобный объект для генетических исследований [6], а также К. Линдгреном [7], которого заинтересовал нейроспорой Т. Х. Морган, близкий друг Доджа.

При использовании нейроспоры для изучения химической генетики мы столкнулись бы с гораздо большими трудностями, если бы в результате работ Кёгля [8] и дю Виньо [9] в нашем распоряжении не оказалось синтетического биотина. Крайне полезными для нас оказались также исследования питания *Ascomyces*, проведенные Нильсом Фризом [10]. Об этом свидетельствует хотя бы то, что им была описана минимальная синтетическая среда, которую в течение многих лет используют при работе с нейроспорой. К описанной им среде был лишь добавлен биотин, и с тех пор она обычно называется «средой Фриза». Нужно также отметить, что только в результате открытий Рентгена и исследований Г. Меллера, показавшего мутагенность рентгеновых и ультрафиолетовых лучей для дрозофилы, оказалось возможным получать столь желанные мутантные штаммы с измененными условиями питания. Нам оставалось лишь сопоставить различные факты и открытия, получить в лаборатории посредством облучения мутантные штаммы нейроспоры, дефектные по питательным потребностям (ауксотрофные), и показать, что каждый независимо индуцированный дефект связан с мутацией в отдельном гене [11].

Основная предпосылка для проведения удачных опытов на нейроспоре заключалась в том, что биохимические процессы, связанные с синтезом существенных компонентов клетки, контролируются генами и могут изменяться вследствие генных мутаций. Поэтому естественно представлялось желательным проверить это и на бактериях, у которых отмечается так много разнообразных требований к факторам роста, и посмотреть,

не появ
извест
tobacte
ший в
иссле

Те

ризы
изучен
гивали
шестве
ращени
мы до
E. coli
исполь
биохим
что в п
мисс Э

Дру

Колум
возилс
я пере
в то вр
с Райа
все вы
между
нулся
ния по
тельств
успешн
выделя
очень р
ностью
были п
E. coli.
на роли
еще ра
професс
кую пр

Тепе
останов
нию и
проведе
положе
к следу
ролирую
на сери
контрол
случае
1 : 1; 4/
собности
цию. Ка
но под
в том,
и специ
кает то
ски люб
рии до

не появятся ли и при их облучении аналогичные дефекты в питании. Общеизвестно, что первые мутанты такого типа были успешно получены у *Acetobacter* и у *E. coli* [12]; таким образом был сделан первый шаг, позволивший ввести бактерии в число организмов, пригодных для генетических исследований.

Теперь нужно указать на некоторые курьезные совпадения или капризы судьбы, случающиеся в науке. В первых сериях биохимически изученных мутантов нейроспоры были такие, у которых нарушения затрагивали биосинтез триптофана. В связи с ролью индола в качестве предшественника триптофана нам хотелось изучить и обратный процесс превращения триптофана в индол. Эта реакция типична для *E. coli*. Поэтому мы достали в отделе бактериологии Станфорда типичную культуру *E. coli*, называвшуюся K-12. Естественно, что позднее этот же штамм был использован и для получения мутантов. Поэтому вскоре мы имели много биохимически маркированных мутантных штаммов *E. coli* K-12. Любопытно, что в получении и выделении этих мутантных штаммов принимала участие мисс Эстер Циммер, позднее ставшая Эстер Ледерберг.

Другое интересное совпадение состоит в том, что Ф. Дж. Райан из Колумбийского университета, находясь в отпуске, некоторое время возился в Станфорде с нейроспорой. Вскоре после того, как в 1945 г. я перешел в Иельский университет, Райан подбил Ледерберга, бывшего в то время студентом-медиком в Колумбии и немного работавшего вместе с Райаном с нейроспорой, провести некоторое время у меня в Иеле. Как все вы знаете, Ледербергу удалось показать генетическую рекомбинацию между мутантными штаммами *E. coli* K-12 [13], и он больше уже не вернулся к медицине, а продолжил в Висконсине свои блестящие исследования по рекомбинации у бактерий. Как бы то ни было, первые доказательства наличия у бактерий процесса, аналогичного половому, оказались успешными только потому, что имелись генетические маркеры, резко выделяющиеся по своему характеру, что и позволило обнаружить это очень редкое событие. Успех этих опытов был обусловлен также совокупностью обстоятельств, приведших к тому, что эти селективные маркеры были получены у одного из редких способных к рекомбинации штаммов *E. coli*. Подводя итог этой части истории, я не только хочу снова указать на роль, которую играют в развитии событий совпадение и случай, но еще раз подчеркнуть большие заслуги моих близких друзей и коллег профессора Бидла и профессора Ледерберга, с которыми я разделял редкую привилегию и честь удостоиться Нобелевской премии.

Теперь я коротко (и по необходимости несколько поверхностно) остановлюсь на некоторых проблемах и областях биологии, возникновению и развитию которых способствовали эти довольно простые опыты, проведенные на нейроспоре. Сначала, однако, подведу итог основным положениям, использованным в этой работе. По существу они сводятся к следующему: 1) все биохимические процессы во всех организмах контролируются генами; 2) эти общие биохимические процессы разделяются на серии отдельных ступенчатых реакций; 3) каждая отдельная реакция контролируется непосредственно одним геном; иными словами, в каждом случае между геном и биохимической реакцией имеется соотношение 1:1; 4) поэтому мутация в отдельном гене приводит к изменению способности клетки осуществлять лишь одну первичную химическую реакцию. Как уже несколько раз указывалось, основная гипотеза, многократно подтвержденная прямыми экспериментальными данными, состоит в том, что каждый ген контролирует образование, функционирование и специфичность одного определенного фермента. А из такой связи вытекает то важное в экспериментальном отношении следствие, что теоретически любая биохимическая реакция в клетке любого организма (от бактерии до человека) может быть изменена в результате мутации гена; каждая

такая мутантная линия клеток отличается от родительской немутантной линии лишь одной первичной реакцией. Излишне напоминать, что правильность этого положения была многократно подтверждена и многие исследователи в течение последних 15 лет или более получали и выделяли биохимически мутантные штаммы микроорганизмов почти у всех испытанных видов бактерий, дрожжей, водорослей и грибов.

Также явно излишне подробно останавливаться на том, что для обнаружения и детального изучения механизмов генетической рекомбинации у микроорганизмов, часто весьма необычных, удобно использовать мутантные штаммы, такие, например, как те, которые были первыми получены и выделены у нейроспоры и у *E. coli*.

Точно так же очевидно излишне даже упоминать о той роли, которую играют мутантные штаммы микроорганизмов при выяснении путей биосинтеза существенных для клетки соединений. Тем не менее, мне хотелось бы перечислить некоторые из биосинтетических реакций, открытие и изучение которых стало возможным в значительной степени в результате использования биохимических мутантов. Сюда относятся: синтез ароматических аминокислот через дигидрошикимовую и шикимовую кислоты [14, 15]; синтез фенилаланина через префеновую кислоту [16] и триптофана — через антралиловую кислоту, индолглицерофосфат [17] и через соединение индола с серином [18]; превращение триптофана в пикотиновую кислоту через кинуренин и 3-оксиантралиловую кислоту [19, 20]; биосинтез гистидина [21]; биосинтез изолейцина и валина через сходные диокси- и кетокислоты [22]; биосинтез пролина и орнитина из глутаминовой кислоты [23]; синтез пиримидинов через оротовую кислоту [24].

Если предполагаемая связь между генами и ферментами действительно существует, то можно предсказать некоторые ее следствия. Во-первых, мутации должны приводить к образованию измененного белка, который может быть ферментативно неактивным или слабо активным. Измененный белок может иметь другие физические свойства, в частности те, изменение которых легко можно обнаружить. И действительно, во многих случаях было показано, что мутантные штаммы образуют белки, у которых изменена устойчивость к нагреванию, ферментативная активность или какие-нибудь другие свойства, например энергия активации [25—31]. Нужно думать, что при тщательном сравнении структуры нормального и измененного ферментов с помощью методов, подобных изыскным методам Сенджера, выяснится молекулярная основа таких изменений. Исследование, проведенное недавно Ингрэмом на гемоглобине [32], ясно показало, что непосредственный эффект генной мутации может заключаться в простой замене одной аминокислоты другой и тем не менее приводит к глубоким вторичным изменениям структуры и свойств белка. Наиболее важный материал для дальнейшего изучения этих вопросов неизбежно дадут искусственно полученные мутантные штаммы микроорганизмов.

Другое следствие предполагаемой связи между генами и ферментами основано на представлении, что генетическая конституция определяет возможности клетки, а время и степень проявления этих возможностей до некоторой степени зависят от внешних условий. Изучение вторичного контроля такого типа на биохимическом уровне составляет одну из важных и увлекательных новых областей биохимии. Эта отрасль имеет дело с регуляцией и интеграцией биохимических реакций посредством механизмов обратной связи, ограничивающих синтез или активность фермента [33—36], с индукцией биосинтеза фермента субстратом [37]. Возможно, что некоторые генные мутации могут влиять на биохимические активности и на этом уровне (модификаторы и супрессоры) и что химические мутанты будут иметь огромное значение при изучении деталей таких механизмов регуляции.

Такая
была от
в сопо
комбин
Наличи
возмож
генетич
ции, то
ские ре
зано Д
трипто

Что
риала,
клетки
ных об
же фер
активн
зовани
ных в
помент
и у А
ской ст
но при
и к пр

Пре
сущест
останов
цины.

Исп
культу
ра. Чт
извест
водства
циллин
мингом
штамми
довате
Оборот
ровани
это оч
лечени
дозы и
в резул
генетич
тания
биотик
времен

В к
генети
лейкоз
ятно,
оказы
тическ
против
которы
ских с
подбор

Такая же увлекательная, только еще создающаяся область генетики была открыта Бензером [38] при работе с бактериофагом. Она заключается в сопоставлении тонкой структуры гена в отношении мутирования и рекомбинации с его тонкой структурой в отношении функционирования. Наличие биохимических мутантов микроорганизмов сделало недавно возможным исследование такого типа на двух уровнях организации генетического материала. Что касается более высокого уровня организации, то оказалось, что контролирующие последовательные биосинтетические реакции неаллельные гены генетически сцеплены. Это было показано Демерецем и Хартманом для генов, контролирующих биосинтез триптофана и гистидина у сальмонеллы [39].

Что касается более тонкого уровня организации генетического материала, то способность нейроспоры образовывать гетерокариотические клетки позволила показать [40—42], что поврежденные мутациями в разных областях одного и того же локуса гены, контролирующие один и тот же фермент, комплементируют в гетерокарионе, образуя ферментативно активный белок. Это восстановление, возможно, происходит путем образования в цитоплазме активного белка из продуктов двух генов, дефектных в разных участках, аналогично восстановлению рибонуклеазы из компонентов *a* и *b*. Такое явление комплементации, обнаруженное также и у *Aspergillus* [43], позволяет провести тонкое картирование генетической структуры в терминах функции. Это направление исследований должно привести к углублению знаний о механизме образования ферментов и к прояснению роли генов в синтезе белка.

Представления биохимической генетики были и несомненно будут существенными для самых разных областей биологии. Позвольте мне остановиться на некоторых примерах из области микробиологии и медицины.

Использование в микробиологии мутантных штаммов бактериальных культур все больше проясняет значение для эволюции мутирования и отбора. Что же касается непосредственного практического применения, то известно первостепенное значение мутирования для улучшения производства антибиотиков — как, например, в классическом случае с пенициллином. Если выход пенициллина, вскоре после его открытия Флемингом, составлял всего около 40 единиц на 1 мл культуры, то теперь штаммы, полученные из тех же культур в результате длинной серии последовательных мутаций, дают приблизительно до 4 000 единиц на 1 мл. Обратной стороной медали является возникновение в результате мутирования микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам. Для медицины это очень существенно. Применение массивных доз антибиотиков при лечении является прямым следствием генетической концепции. Массивные дозы используются для того, чтобы уменьшить число бактерий, у которых в результате мутирования могла бы возникнуть устойчивость. Следствием генетической концепции является также и применение при лечении сочетания антибиотиков. Для возникновения устойчивости к двум антибиотикам потребовалось бы изменение в результате мутирования одновременно двух независимых признаков.

В качестве важного примера применения тех же концепций микробной генетики к клеткам млекопитающих можно сослаться на устойчивость лейкозных клеток к химиотерапевтическим агентам, которая имеет, вероятно, мутационную природу [44]. Поэтому при лечении эффективным оказывается одновременное использование двух или более химиотерапевтических агентов. В связи с этим можно отметить, что из найденных пока противораковых химиотерапевтических агентов наиболее эффективны те, которые препятствуют синтезу ДНК. Более детальное знание биохимических стадий этого синтеза сделает возможным и более рациональный подбор противораковых средств. Кстати, мне хотелось бы указать на ана-

логию между ситуацией в бактериальной культуре, состоящей из двух или более типов клеток, и ситуацией, связанной с конкуренцией и выживанием злокачественной клетки, независимо от ее происхождения, в популяции нормальных клеток. Нужно ожидать, что изменение окружающих условий, вызванное, например, химиотерапией, будет влиять на эффективность обмена измененной клетки и, следовательно, на ее рост. Однако, по-видимому, изучить вызванное взаимодействием между клетками разных типов влияние того или иного давления отбора на бактериальные популяции, так же как и изучить влияние химиотерапевтических агентов на эффективность давления отбора в популяциях клеток млекопитающих, можно наиболее успешно лишь в контролируемо смешанных популяциях клеток исследуемых типов.

Концепции генетики приобретают все большее как теоретическое, так и практическое значение и в других областях онкологии. Представляется возможным, что изменения клетки при ее злокачественном перерождении непосредственно связаны с изменениями в ее биохимии. Выявленные за последние десятилетия связи между ДНК, РНК и ферментами заставляют приглядеться к изменениям, происходящим при злокачественном превращении в тесно переплетенных иерархиях клеточного материала.

Известно, что наследуемые изменения ДНК могут возникать в результате мутирования или как следствие введения нового генетического материала либо прямо (как при трансформации), либо при вирусной инфекции (как при трансдукции). Теоретически в возникновении рака может принимать участие любое из этих изменений наследственности. Но определенные указания существуют только в отношении роли вирусов. Эти работы берут начало от классических исследований Рауса, проведенных на саркоме кур [45]. Генетическое изменение на уровне РНК могло бы происходить также любым из указанных способов. Например, вирус, содержащий РНК, мог бы привести к наследуемому изменению цитоплазматического типа, полуавтономному по отношению к действию гена. Что касается белкового уровня, то, как уже указывалось, имеется регуляторный механизм, определяющий активность генов и синтез ферментов, который также представляет область для интересных исследований.

Из многочисленных приложений концепций и методов генетики микробов к проблеме рака я упомяну еще исследованные Клейном [46] генетические основы иммунологических изменений, отличающих раковую клетку от нормальной, и изученные Паком [47] и Иглоом [48] в условиях культивирования особенности питания, морфологии и мутирования изолированных нормальных и раковых клеток млекопитающих. Эти исследования заложили основу для дальнейшей работы, которая позволит, в конце концов, понять, в чем же природа и каковы причины злокачественности.

Каковы бы ни были причины возникновения раковой клетки и на каком бы генетическом уровне ни происходило первичное изменение, можно надеяться, что в будущем мы сможем исправлять или хотя бы облегчать последствия нарушения обмена, точно так же, как более глубокое понимание врожденного нарушения обмена у человека помогает исправить или вылечить этот дефект. В одних случаях последствия метаболического блока можно исправить диетой, т. е. (говоря терминами биохимической генетики) ограничивая поступление предшественника вредного накапливающегося продукта (в случае фенилкетонурии это ароматические аминокислоты). В других случаях для исправления обмена нужно давать извне необходимый конечный продукт (специфический белок крови при гемофилии или же определенное необходимое для обмена вещество, например витамин).

Недостаток времени не позволяет мне продолжить эти примеры. Возможно, однако, меня извинят, если я рискну коротко высказать некоторые предсказания и надежды на будущее.

Представляется вполне естественным ожидать, что точно так же, как сейчас мы побеждаем болезни бактериального и вирусного происхождения, с увеличением наших знаний о контроле над механизмами деятельности клетки и наследственностью успешнее окажется наша борьба с такими болезнями, как врожденные нарушения обмена и пока более таинственные рак и болезни перерождения.

Когда мы больше будем знать о функционировании и регулировании активности генов при дифференцировке и развитии, можно будет более действенно контролировать и регулировать эти процессы. Тогда можно будет не только предотвращать возникновение в развивающемся организме нарушений структуры или обмена, но и создавать более совершенные организмы.

Возможно, еще при жизни некоторых из присутствующих здесь будет разгадан код жизненных процессов, связывающий молекулярные структуры белков и нуклеиновых кислот. Это может позволить улучшать живые организмы посредством того, что можно было бы назвать биологическим конструированием.

Биологическое конструирование может постепенно перейти от биосинтеза *in vitro* все более эффективных и совершенных ферментов к биосинтезу молекул соответствующих нуклеиновых кислот. Затем эти молекулы можно будет вводить в геном организма посредством инъекции, внесения вируса в половые клетки или же с помощью процесса, аналогичного трансформации. Может быть, удастся достичь той же цели иным путем, используя направленное мутирование.

Как биолог, и в особенности как генетик, я глубоко верю в изменчивость гена и живых организмов. Эта изменчивость дает материал, который отвечает требованиям жизни на любом уровне. В ответ на внешние давления всех типов, в том числе социологические и интеллектуальные, происходят отбор, выживание и эволюция. Если брать проблему шире, то опасные, плохо изученные и мало контролируемые силы современной цивилизации, в том числе атомная энергия и сопровождающие ее опасности, представляют собой лишь более сложные требования, предъявляемые жизни средой. Если человек не сможет удовлетворить этим требованиям, то в биологическом смысле он не сможет выжить.

Но можно твердо надеяться, что вместе с действительным пониманием роли наследственности и среды, вместе с развитием физических способностей человека и уменьшением его зависимости от болезней тела придет и лучшее понимание социологических и экономических проблем, изменится к лучшему подход к этим проблемам. Как в любом научном исследовании, когда проблема ясно поставлена, она уже наполовину решена. Поэтому можно предвидеть наступление возрождения, когда человечество разрешит основные социологические проблемы и сделает гигантский шаг к установлению на земле братства, взаимного доверия и благополучия, которое предсказывал большой филантроп и гуманист Альфред Нобель.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. L. Tatum, H. G. Wood and W. H. Peterson. *Biochem. J.*, 1936, 30, 1898.
2. Y. Khouvine, B. Ephrussi and S. Chevais. *Biol. Bull.*, 1938, 75, 425.
3. E. L. Tatum. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 1941, 27, 193.
4. E. L. Tatum and G. W. Beadle. *Science*, 1940, 91, 458.
5. E. L. Tatum and A. J. Haagen-Smit. *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, 575.
6. B. O. Dodge J. *Agric. Res.*, 1927, 35, 289.
7. C. C. Lindgren. *Bull. Torrey Bot. Club.*, 1932, 59, 85.

8. F. Kögl. Ber., 1935, 68, 16.
9. V. du Vigneaud. Science, 1942, 96, 455.
10. N. Fries. Symbolae Bot. Upsalienses, 1938, 3, 1.
11. G. W. Beadle and E. L. Tatum. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1941, 27, 499.
12. E. L. Tatum. Cold. Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1946, 11, 278.
13. J. Lederberg and E. L. Tatum. Nature, 1946, 158, 558.
14. B. D. Davis. In: Amino Acid Metabolism. 1955, Baltimore, p. 799.
15. E. L. Tatum, S. R. Gross, G. Ehrensward and L. Garbjobst. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1954, 40, 271.
16. R. L. Metzenberg and H. K. Mitchell. Biochem. J., 1958, 68, 168.
17. C. Yanofsky. J. Biol. Chem., 1957, 224, 783.
18. E. L. Tatum and D. M. Bonner. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1944, 30, 30.
19. D. Bonner. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1948, 34, 5.
20. H. K. Mitchell and J. F. Nye. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1948, 34, 1.
21. B. N. Ames. In: Amino Acid Metabolism. Baltimore, 1955.
22. E. A. Adelberg. J. Bact., 1951, 61, 365.
23. H. J. Vogel. In: Amino Acid Metabolism. Baltimore, 1955.
24. H. K. Mitchell, M. B. Honlahan and J. F. Nye. J. Biol. Chem., 1948, 172, 525.
25. W. K. Maas and B. D. Davis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1952, 38, 785.
26. N. H. Horowitz and M. Fling. Genetics, 1953, 38, 360.
27. T. Yura and H. J. Vogel. Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 582.
28. J.R.S. Fincham. Biochem. J., 1957, 65, 721.
29. D. R. Suskind and L. I. Kurek. Science, 1957, 126, 1068.
30. N. H. Giles, C. W. H. Partridge and N. J. Nelson. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, 305.
31. T. Yura. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.
32. V. M. Ingram. Nature, 1957, 180, 326.
33. H. J. Vogel. In: Symposium on the Chemical Basis of Heredity, Baltimore, 1957. (Сб.: Химические основы наследственности. М., ИЛ, 1960, стр. 218.)
34. L. Gorini and W. K. Mass. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 208.
35. R. A. Yates and A. B. Pardee. J. Biol. Chem., 1956, 221, 757.
36. H. E. Umbarger and B. Brown. J. Biol. Chem., 1958, 233, 415.
37. M. Cohn and J. Monod. Symposium Soc. Gen. Microbiol., 1953, 3, 132.
38. S. Benzer. In: Symposium on the Chemical Basis of Heredity. Baltimore, 1957. (Сб.: Химические основы наследственности. М., ИЛ., 1960, стр. 56.)
39. P. E. Hartman. In: «Symposium on the Chemical Basis of the Heredity», Baltimore, 1957. (Сб.: Химические основы наследственности. М., ИЛ, 1960, стр. 324.)
40. N. H. Giles, C. W. H. Partridge and N. J. Nelson. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, 305.
41. M. E. Case and N. H. Giles. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1958, 44, 378.
42. J. A. Pateman and J.R.S. Finchman. Heredity, 1958, 12, 317.
43. E. Calef. Heredity, 1956, 10, 83.
44. L. W. Law. Nature, 1952, 169, 628.
45. P. Rous. J. Exp. Med., 1910, 12, 696.
46. G. Klein, E. Klein and L. Révész. Nature, 1956, 178, 1389.
47. T. T. Puck. In: «Symposium on Growth and Development». Princeton, 1957.
48. H. Eagle, V. I. Oyama, M. Levy and A. E. Freiman. Science, 1956, 123, 845.

Ноб
голь
при
эту
и ко
С
гене
у ба
поль
моей
41, 4
тель
с ба
нуть
Т
учен
То,
жае
знач
Одна
в со
в ко
в бе
леоти
хими
до мо
взаи
кой
сосед
прее
Б
нует
и зад
проду
оцен
важн
микро
тичес
иссле
лучне
отделе
К сча
тежом
Полу
1959
Нобе
 совме

Приложение VIII

ОБЗОР ГЕНЕТИКИ

ДЖОШУА ЛЕДЕРБЕРГ

Нобелевская лекция¹

Нобелевский статут 1900 г. требует, чтобы каждый лауреат прочел в Стокгольме публичную лекцию не позднее, чем через шесть месяцев со дня присуждения премии. Я не без задней мысли полностью использовал эту отсрочку, так как она дала мне возможность навестить многих друзей и коллег в вашем прекрасном городе в самое лучшее время года.

Статут, возможно, требует исторического доклада об «исследованиях генетической рекомбинации и организации генетического материала у бактерий», исследованиях, в проведении которых мне посчастливилось пользоваться товарищеской помощью многих коллег, и в первую очередь — моей жены. Однако этому вопросу посвящено много обзоров [36, 37, 38, 41, 42, 45, 49, 54, 55, 58]. Поэтому я склонен взять на себя более умозрительную задачу рассмотреть направления современной науки, связанные с бактериальной генетикой, чтобы ее можно было глубже понять и взглянуть на перспективы экспериментальной генетики.

То, что Нобелевскую премию в области генетики разделили несколько ученых, символизирует сближение усилий исследователей всего мира. То, что премия присуждена за генетику, тоже своевременно — это отражает ее роль как стержня в структуре понятий биологии и возрастающее значение ее как для теоретической, так и для практической медицины. Однако экспериментальная генетика достигает полной своей силы лишь в сочетании с биохимией: в принципе, каждый фенотип должен быть, в конце концов, обозначен точной последовательностью аминокислот в белке [79], а генотип — соответствующей последовательностью нуклеотидов в ДНК [63]. Проводить точную границу между генетикой и биохимией уже бесполезно. Но когда генетика будет полностью сведена до молекулярного уровня, то генетика и биохимия могут остаться в тех же взаимоотношениях, какие существуют между термодинамикой и механикой [69]. Приведение в соответствие друг с другом такого большого числа соседних областей знания обязательно должно потребовать от наших преемников достаточных умственных способностей.

Большое значение бактерий и их генетики для всей биологии знаменует новый этап в нашем научном мировоззрении. Раньше, если о них и задумывались, то часто относили их к каким-то таинственным побочным продуктам эволюции, а связь их с другими организмами сильно недооценивали. «Со времен удивительных открытий Пастера, показавших ту важную роль, которую играют микробы в человеческой деятельности, микробиология как наука всегда страдала от своей замечательной практической направленности. Надолго большинство микробиологических исследований имели целью дать ответ на вопросы, связанные с благополучием человечества» [30]. Сохранению такого искажения способствовало отделение обучения академической биологии от медицинского образования. К счастью, репатриация бактерий и вирусов является лишь первым платежом в счет долга медицины перед биологией [6—8].

¹ Получено для публикации 14 мая 1959 г. Нобелевская лекция, прочитанная 29 мая 1959 г. в Королевском Каролинском медико-хирургическом институте в Стокгольме. Нобелевская премия по физиологии и медицине была присуждена 10 декабря 1958 г. совместно Г. В. Бидлу, Е. Л. Татуму и Дж. Lederbergу.

Объединение биологии, начатое сто лет назад Дарвином, завершает сравнительная биохимия. Во всем живом мире мы видим один и тот же набор структурных единиц, из которых строится каждый организм, — аминокислот, коферментов, нуклеотидов, углеводов и т. д. То же самое имеет место и в отношении основных процессов биосинтеза и энергетического обмена. Особый интерес представляют поэтому исключения из этого правила — полные смысла признаки биологической индивидуальности, например замещение цитозина оксиметилцитозином в ДНК фага T2 [12].

Особенно плодотворным оказалось изучение питания. Ранее бактерии, которые не нуждаются в витаминах, казались проще человека. Но более вдумчивые авторы [32, 61] поняли, что простые потребности в питании означают большие способности к синтезу. Нужды более требовательных организмов охватывают как раз те соединения, которые они не могут синтезировать с помощью своих собственных ферментов.

Виды различаются пищевыми потребностями. Следовательно, если виды отличаются генами, то гены должны контролировать этапы биосинтеза, определяющие пищевые потребности. Этот силлогизм, некогда высказанный в таком ясном виде, был развит Бидлом и Татумом. Значение его для экспериментальной биологии и медицины, в том числе и для методологии бактериальной генетики, хорошо известно. Татум уже рассказал, как его ранние опыты по исследованию питания бактерий подкрепили основания биохимической генетики нейроспоры. Затем, несмотря на всеобщее мнение, что бактерии слишком просты для того, чтобы обладать генами, Татум набрался храбрости попытаться найти у них гены, которые действительно могли бы контролировать питание бактерий. Это положило начало счастливому для меня содружеству с ним и с теми, кто прокладывал новые пути в бактериальной генетике.

Современные генетические исследования утверждают, что генетический материал представляет собой ДНК, функционирующие системы клетки — белки-ферменты, а РНК является каналом связи между ними [63]. Генетическая функция ДНК подтверждается тремя линиями доказательств. Две из них связаны с генетикой бактерий; третьей, и наиболее общей, является обнаружение с помощью цитохимических методов ДНК в хромосомах, которые несомненно представляют собой вереницы генов. Но хромосомы содержат не только ДНК. Поэтому хотелось бы иметь возможность выделить отдельную хромосому или ее фрагмент, изучить ее и пересадить, чтобы проверить ее функциональные способности. Впечатляющие результаты, достигнутые при трансплантации ядер [29], придают смелость, необходимую для того, чтобы отважиться на такой опыт. 30 лет назад бактериолог открыл соответствующий эквивалент трансплантации хромосом [20]. Некоторые из последователей Гриффита не были уверены в том, что при «трансформации пневмококков» затронута генетика, так как при этом изменялась лишь способность бактерии образовывать клейкую наружную капсулу. Однако в 1943 г. Эйвери с сотрудниками показали, что этот наследуемый признак передается от одного штамма пневмококков другому посредством ДНК. Поскольку тем же механизмом передаются и другие признаки [25], то это может означать лишь, что гены состоят из ДНК¹.

В подтверждение этого вывода Херши и Чейз [23] доказали, что генетическим элементом бактериального вируса также является ДНК. Для

¹ Могут попытаться написать: «Одна молекула ДНК — один ген». Однако любая из единиц факториальной генетики, определенная как по мутированию или рекомбинации, так и по ферментной функции, меньше единицы ДНК с молекулярным весом 6×10^6 [4]. Постоянно накапливаются данные, что такая молекула не является артефактом, получающимся путем фрагментации, то действительно представляет собой природную единицу.

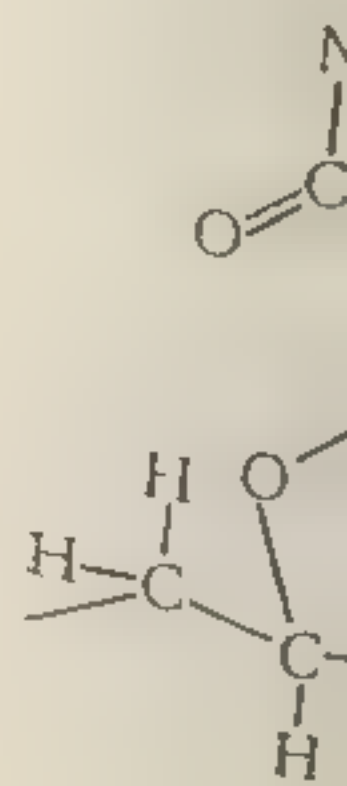


РИС. V
Первич
ЦГГТ

инфицирования клетки достаточно проникновения лишь ДНК, содержащейся в адсорбированной частице. Эта ДНК контролирует не только свою собственную репликацию при образовании нового фага, но и специфичность белковой оболочки, которая определяет серологическую специфичность и специфичность фага по отношению к хозяину.

РНК также выполняет генетические функции, по крайней мере у некоторых мелких вирусов. Однако автономная роль в наследственности цитоплазматической РНК, образующейся под влиянием генов, сейчас представляется очень сомнительной. По крайней мере некоторые из плазматических РНК, которые, как предполагали, выполняют такую функцию, считаются сейчас системами переноса субстрата, регулируемые по принципу обратной связи [65, 72, 81].

Таким образом, исследования последнего десятилетия подтверждают правильность того простого представления, что генетическая информация является нуклеиновой, т. е. закодирована в линейной последовательности нуклеотидов. Это упрощение жизни может оказаться слишком поверхностным и стать соблазнительной мишенью для критики агностиков [37, 41, 44, 74]. Но так как никакую научную теорию нельзя порицать за постоянное усовершенствование и доработку, то такая критика мало существенна, если она направлена на то, что в теории вполне удовлетворяет данным эксперимента.

Клетка может, конечно, кроме полинуклеотидных последовательностей, содержать в цитоплазме или в хромосомах еще и информацию, не имеющую нуклеиновой природы. Во многих предложенных недавно теориях цитодифференцировки и в моделях такого процесса, как смена антигенных фаз у *Salmonella* [47, 52, 56, 71], фигурирует эпинуклеиновая информация, не определенная более точно. Альтернативные схемы имеют настолько меньшую емкость информации, чем нуклеиновый цикл, что они могли бы еще иметь отношение к регуляции функционирования генов, но не могут воспроизвести специфичности самих генов.

ДНК КАК ВЕЩЕСТВО

Химия ДНК заслуживает того, чтобы ее излагали настоящие мастера [13, 31, 86]. А я до того, как перейти к биологической роли ДНК, лишь подведу итог тому, что известно о ее химии. На рис. 1 показан участок

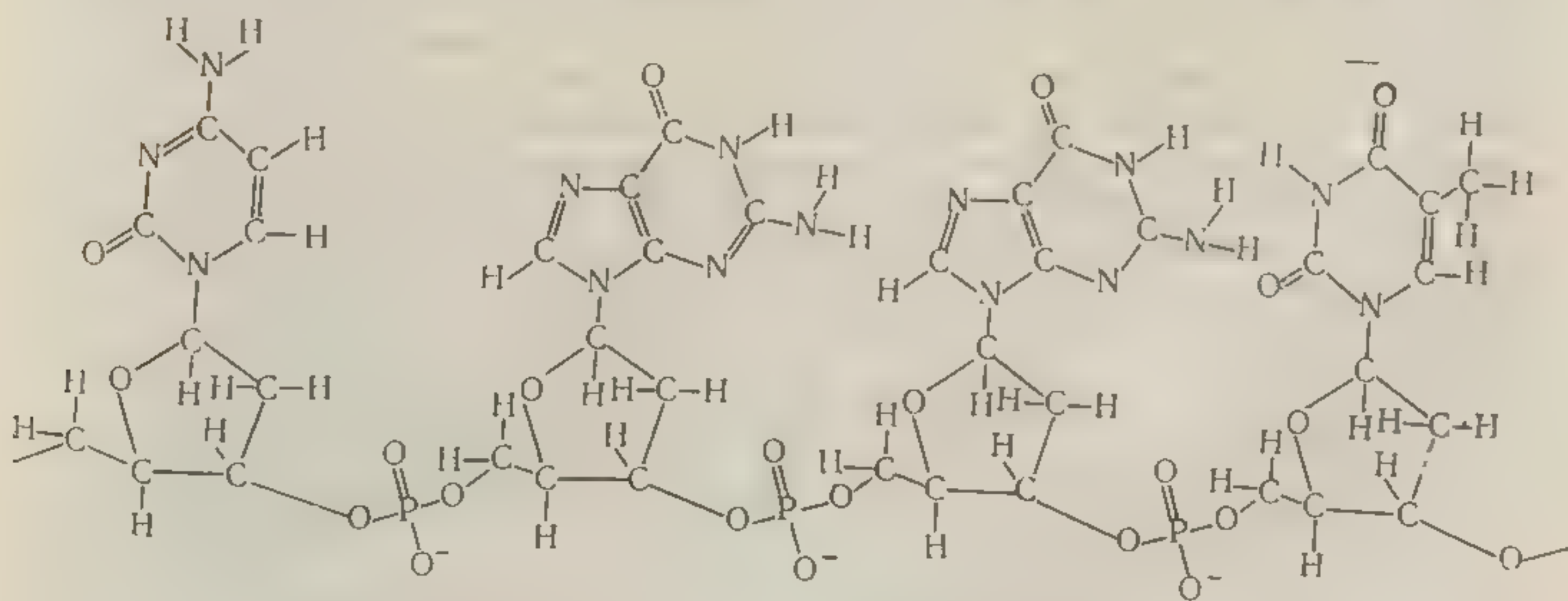


РИС. VIII-1.

Первичная структура ДНК — участок с полинуклеотидной последовательностью ЦГГТ [13]

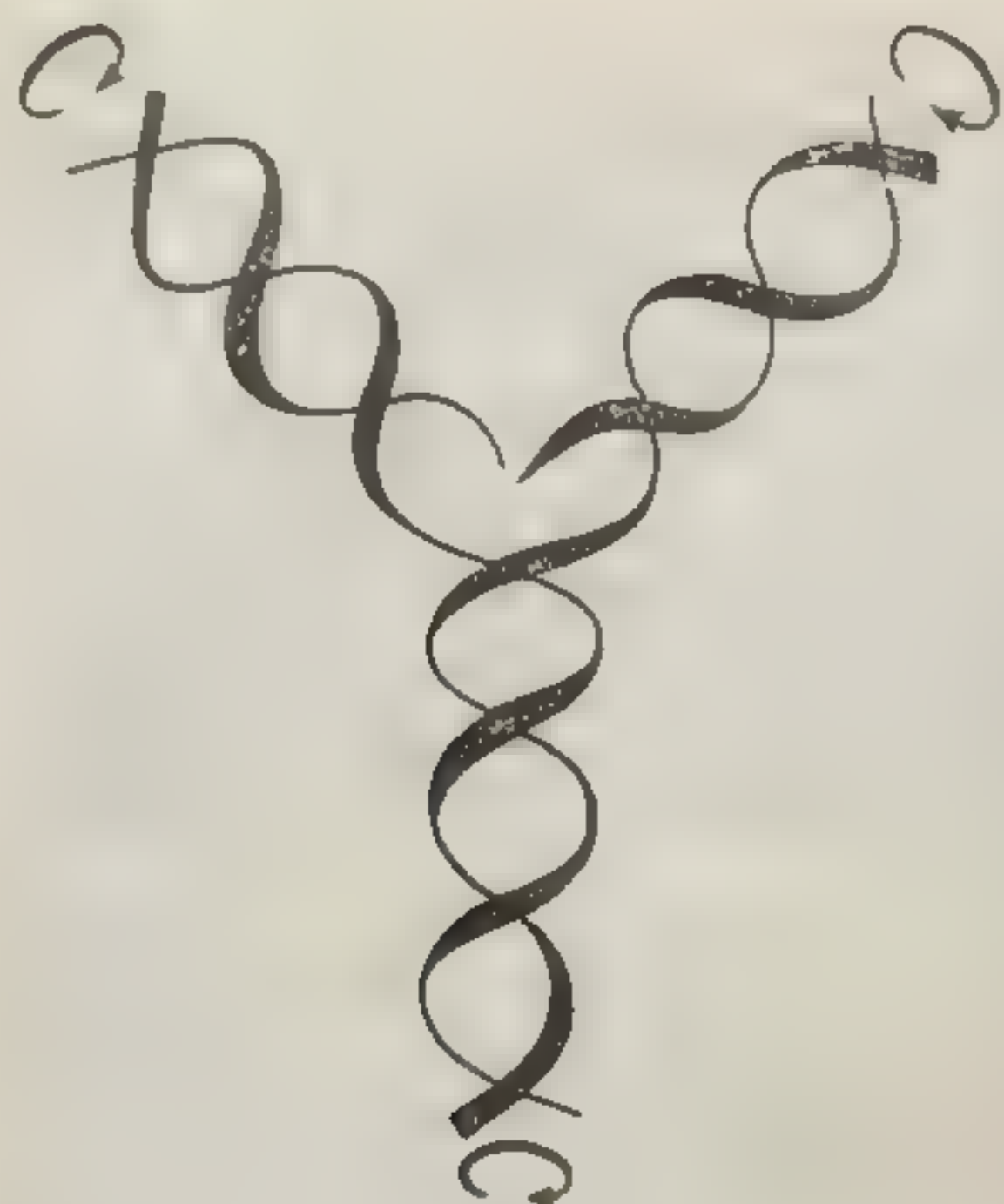
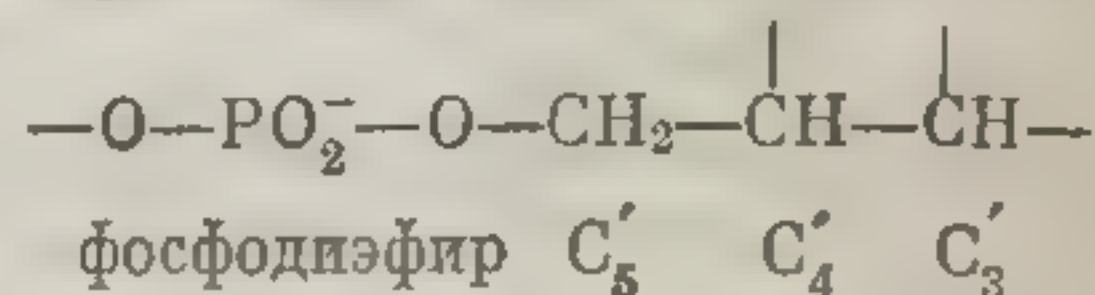


РИС. VIII-2.

Схема репликации ДНК по Уотсону и Крику. «Раскручивание и репликация протекают *pari passu*. Все три плеча Y вращаются так, как показано стрелками» [14]

цепи ДНК. Она представляет собой линейный полимер, скелет которого состоит из повторяющихся единиц:



Атомы углерода пронумерованы, как условлено, в соответствии с их положением в фуранозном кольце дезоксирибозы. Дезоксирибоза связана через N-гликозид с одним из оснований: аденином, гуанином, цитозином или тиминном. Эти основания обозначаются как А, Г, Ц и Т и составляют известный теперь всем алфавит, с помощью которого записывается генетическая информация. При длине цепи около 10 000 остатков молекула ДНК содержит 20 000 «битов информации», что сравнимо с количеством букв в этой статье или на странице газеты.

Было обнаружено, что метаболическими предшественниками ДНК явля-

ются активированные пирофосфатом мономерные единицы (например, тимидинтрифосфат) [31]. При репликации генома мономерные единицы должны связаться, образуя последовательность, которая отражает последовательность родительской молекулы. Правдоподобный механизм репликации был предложен Уотсоном и Криком [87] как естественное следствие их модели структуры ДНК. В соответствии с этой моделью ДНК является двухнитчатой спиралью с направленными внутрь основаниями. Когда основания закреплены на дезоксирибозофосфатных цепях, только две пары оснований способны образовывать водородные связи между имеющимися в них группами NH и CO. Это пары А : Т и Г : Ц. Такое спаривание оснований соединяет две нити вдоль всей спирали. Эта модель подтверждается многочисленными данными по определению состава, которые показывают замечательное равенство А с Т и Г с Ц в ДНК из разных источников. Следовательно, две нити любой ДНК взаимно комплементарны. А, Т, Г и Ц одной нити противостоят, соответственно, Т, А, Ц и Г в другой нити. Поэтому информация, содержащаяся в одной нити, эквивалентна той, что содержится в другой, так как строение одной нити полностью определяет строение другой. Строение нити ДНК определяется при репликации, когда одна родительская нить путем поэтапного присоединения к ней мономеров образует вторую, комплементарную себе нить. На каждом этапе репликации для удлинения цепи путем эстерификации с соседним нуклеотидом используется только мономер, комплементарный матрице. Модель требует раскручивания спирализованных нитей для того, чтобы каждая из них могла служить матрицей. Такое раскручивание может происходить постепенно, вместе с ростом дочерней цепи. Это представление использовано на рис. 2, который являет собой новую Каббалу. Обнаружение однонитчатого состояния ДНК [85] делает приемлемой и альтернативную модель, включающую полное раскручивание молекулы.

Для вещества, осуществляющего преемственность жизни, ДНК может показаться очень заурядной молекулой. Форма ее определяется однообразным дезоксирибозофосфатным скелетом, монотонность которого и приводит к картинам диффракции рентгеновых лучей, указывающим на высокую кристалличность. Сами по себе основания обладают малой реакционной

способностью, мало отличаются друг от друга, а в ДНК замкнуты друг на друга и взаимно насыщены. Все гидроксилы дезоксирибозы в полимере замещены. Структура ДНК соответствует солипсизму ее функции.

Наиболее правдоподобная функция ДНК заключается в конечном счете в определении аминокислотной последовательности белков. Однако, так как белки строятся из 20 аминокислот, то между нуклеотидами и аминокислотами не может быть соответствия «один к одному». Если учесть, что в комплементарных структурах присутствуют два варианта кода и что нужно указывать промежутки между словами в закодированном сообщении, то получается, что для записи одной аминокислоты требуется три или четыре основания [19].

Хотя белок также определяется последовательностью составляющих его мономерных единиц, аминокислот, однако молекуле белка недостает «апериодичной кристалличности» [80], присущей ДНК. Аминокислоты сильно различаются по величине, форме, заряду (например, $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot$; $\text{COOH}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot$; $\text{HO}\cdot\text{C}_6\text{H}_4\cdot\text{CH}_2\cdot$; CH_3 ; $\text{H}\cdot$), а пролин отличается еще и углами валентности. Биологическая активность белка определяется формой поверхности, ограничивающей уложенную полипептидную цепь [73]. Следовательно, одномерная специфичность ДНК должна переводиться в трехмерную специфичность поверхности фермента или антитела. Наиболее простое допущение состоит в том, что последовательность аминокислот в растянутой полипептидной цепи, в виде которой белок отделяется от матрицы, на которой он строился, и выходит в цитоплазму, полностью определяет конфигурацию белка. Конфигурация белка может, конечно, стабилизироваться непептидными связями. Если это не так, то необходимо ввести некий добавочный механизм, управляющий скручиванием белка. Этот спор достиг кульминации в гипотезах о механизме образования антител. Если глобулины антител имеют одну и ту же последовательность аминокислот, а их специфичность определяется конфигурацией, которой управляет дополнительный механизм, то антиген мог бы прямо формировать соответствующее антитело. Однако если последовательность аминокислот определяет конфигурацию белка, то последняя должна в свою очередь определяться информацией, содержащейся в нуклеиновой кислоте. Так как на эту информацию антиген не влияет, то он должен играть просто селективную роль, производя отбор среди вариантов нуклеиновой кислоты, возникших в результате спонтанных мутаций [8, 50].

Нет указаний на химическое соответствие между аминокислотами и группами нуклеотидов. В настоящее время представляется более вероятным, что этот код в процессе эволюции был вторично случайным образом переведен какими-то биологическими посредниками. В этом случае кодовые связи были бы аналогичны, скажем, связи английской азбуки Морзе (двузначная система) с китайской (пиктографической). Это подтверждается сообщениями нескольких исследователей о ферментативных реакциях аминокислот с фрагментами РНК [22, 75]. По-видимому, для каждой аминокислоты существуют свои собственные акцепторная РНК и фермент, двойная специфичность которого избавляет от необходимости непосредственного узнавания аминокислоты полинуклеотидом. По аналогии с моделью репликации ДНК связь нуклеотидов аминокислот с РНК-матрицей обеспечивает специфичность выстраивания аминокислотных остатков при синтезе белка.

Таким образом, можно представить себе следующие способы переноса информации:

1. Репликация ДНК — сборка комплементарных дезоксирибонуклеотидов на ДНК-матрице.

2. Перенос информации на РНК, осуществляемый посредством сходного механизма сборки рибонуклеотидов. Этот процесс плохо изучен, так как пока не совсем ясна структура РНК [16].

3. Синтез белка:

а) аминокислотирование фрагментов полинуклеотидов;

б) выстраивание нуклеотидов на РНК-матрице по аналогии с процессом (1);

в) конденсация аминокислотных остатков с образованием пептидной цепи. Некоторые исследователи полагают, что кроме образования РНК на ДНК происходит еще и поэтапная репликация РНК [3], одновременно с синтезом белка.

Первичные структуры ДНК и РНК различаются главным образом тем, что в рибозе атом С в 2'-положении содержит гидроксильную группу, так что в сахаре РНК оказывается реакционно способный гидроксил. Может быть, это и определяет меньшую упорядоченность вторичной структуры РНК и функционирование ее в качестве посредника при синтезе белка. Пока не ясно, эстерифицирован ли аминокислотнуклеотидат в C_2 или в C_3 ; он также может быть эстерифицирован и в концевом остатке. Таким образом, основу ДНК составляет инертный, но жесткий каркас, к которому прикреплены различные основания. Пространственные ограничения придают специфичность водородным связям, образуемым между звеньями. Правдоподобна репликация такой структуры. Трудно представить себе другие реакционные группы, кроме нуклеотидов, которые могли бы иметь отношение к этой структуре. Все особенности этой структуры хорошо подходят для хранения информации — такие полимеры, как каучук и пироксилин, слишком бедны для записи информации.

ДНК И МУТАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Ignis fatuus генетики — это специфический мутаген, реагент, который мог бы проникать в определенный ген, узнавать его и специфическим образом изменять. Направленное мутирование у высших организмов уже давно дискредитировано и установлена «коренная неопределенность» мутирования, присущая как спонтанным, так и индуцированным рентгеном мутациям [68]. Однако возникновение резистентности, несомненно индуцированной лекарствами, оживило иллюзии, что гены бактерий можно направленно изменять. Этот вывод неизбежно должен был подорвать концепцию «гена» для этих организмов. Не удивительно, что вокруг механизма резистентности к лекарствам разгорелся столь горячий спор [89]!

Какого типа молекулы могли бы действовать в качестве специфического мутагена, реагирующего с одним определенным геном из всего набора генов бактерии и способного выбрать одну мишень едва ли, менее чем из тысячи? По нуклеиновой гипотезе наименьший сегмент, соответствующий такой мишени, состоит по меньшей мере из *шести* нуклеотидов. Специфический мутаген должен различать все возможные конфигурации этого сегмента. Это, очевидно, осуществимо только с помощью другой молекулы соответственной длины и периодичности, т. е. с помощью аналогичного полинуклеотида. В химическом строении пенициллина или стрептомицина, несомненно, нет ничего, что могло бы указать на прямое воздействие их на информацию, содержащуюся в нуклеиновой кислоте.

К тому же мы не знаем химических реагентов, способных заменять одно основание другим в структуре готовой ДНК. Но так как к мутации может приводить изменение основания, пусть даже вызывающее появление нового основания, которое не встречается в природе, то главным препятствием для специфического мутагенеза остается опознание соответствующей мишени.

Возникновение резистентности к лекарствам, кроме большого теоретического интереса, требует еще особого внимания и само по себе. Возможно, что экспериментальным путем и не удастся объяснить некоторые из еще не изученных ситуаций. Однако каждый хорошо изученный случай насле-

дуемой резистентности можно объяснить спонтанным возникновением резистентных мутантов и их последующим отбором под действием лекарства [5, 10]. Кроме того, при благоприятных условиях, если ухитриться выделить резистентные мутанты без того, чтобы они когда-либо входили в соприкосновение с лекарством, можно четко доказать их спонтанное происхождение. Один из таких методов включает непрямой отбор. Я покажу его применение на таком примере. Пусть культура *Escherichia coli* содержит 10^9 бактерий на 1 мл. Высевая пробы на агар, содержащий стрептомицин, мы обнаруживаем, что устойчивые к стрептомицину колонии образует одна бактерия из миллиона, или 10^3 на 1 мл. Но чтобы подсчитать эти клоны, их нужно было высеять на среду со стрептомицином, который гипотетически мог бы индуцировать резистентность. Однако мы можем развести исходные бактерии в полноценной среде и отобрать пробы, содержащие по 10^5 бактерий на 1 мл. Так как резистентны 10^{-6} бактерий, то для каждой пробы математическое ожидание того, что она содержит устойчивую бактерию, равно 0,1. Так как отдельную бактерию при разведениях разделить нельзя, то в девяти пробах из десяти резистентных бактерий не будет. В десятой пробе будет одна резистентная бактерия, но теперь в этой пробе доля резистентных бактерий возросла до 10^{-5} . То, что там была именно одна резистентная бактерия, легко можно установить при ретроспективном анализе инкубируемых проб. Для обогащения резистентными организмами эту процедуру можно повторять до тех пор, пока они не получатся в чистой культуре [11]. Того же результата можно достичь, если высеять исходную культуру на чашку с питательным агаром, что удобнее, чем разливать пробы по отдельным пробиркам. Испытание инокулятов, рассеянных по пробиркам, заменяется в этом случае техникой отпечатков, при которой то, что вырастает на поверхности чашки, переносится с помощью куска бархата на другую чашку [53]. Итак, отбор проб с разведением и метод отпечатков являются альтернативными методами непрямой селекции, с помощью которых удастся избежать прямого контакта испытуемой линии с лекарством. При таком отборе сохраняются сублинии, *сиблинговые* клоны которых резистентны. Такое доказательство только подтверждает убедительные доводы, выдвигавшиеся многими авторами.

Как возникают мутации, если они не являются специфическими ответами на окружающие клетку условия? Мы еще мало знаем о непосредственных причинах возникновения как спонтанных мутаций, так и мутаций, индуцированных радиацией или химическими веществами. Большинство химических мутагенов являются сильными алкилирующими агентами, например формальдегид или азотистый иприт, которые взаимодействуют с многочисленными реакционными группами в клетке. Подобные соединения могут появляться и при нормальном обмене и вызывать часть наблюдаемых спонтанных мутаций. Они могут также играть роль промежуточных химических соединений при действии излучений. Поэтому большинство исследований мутагенеза, особенно при действии более сильных реагентов, мало может сказать нам о химии гена. Вероятно, любой агент, который может проникать к хромосомам и вызывать локальное химическое изменение, способен вносить случайные ошибки в генетическую информацию. Большинство токсичных агентов, несомненно, были бы мутагенными, если бы они раньше не убивали клетку посредством других механизмов.

Другой класс мутагенных химических соединений обещает дать больше информации. Это аналоги естественных оснований, входящих в ДНК. Например, если зараженным бактериям скормить бромцезоксиуридин, то бромурацил специфически замещает тимин в фаговой ДНК. С помощью крайне тонкого генетического анализа Фриз показал, что у фага T4 мутации, индуцированные таким образом, локализованы иначе, чем спонтанные или индуцированные другими химическими веществами [18]. По-видимому,

с помощью этого метода картируется расположение тимина в исходной ДНК. Для объяснения значительных различий частот возникновения мутаций в разных локусах нужно допустить еще и взаимодействие между нуклеотидами. В настоящее время именно эти исследования наиболее приближаются к направленному химическому мутагенезу. Однако в каждом гене момент содержится много мишеней для любого аналога оснований, и специфичность такого мутагенеза может быть обнаружена лишь в системах, где разрешение генетических локусов приближается к расстоянию между отдельными нуклеотидами [4]. Сейчас это осуществимо только на микроорганизмах. Огромный интерес должны представлять подобные исследования на бактериях и грибах.

Более специфические эффекты могут получиться при использовании олиго- и полинуклеотидов. Однако осуществлению такой программы мешают разные технические трудности: даже если и удастся синтезировать требуемые полимеры, трудно ввести их в клетку. Перенос соответствующих генетических признаков с помощью ДНК, выделенной из мутантных бактерий, рассматривается как «генетическая трансдукция».

Другим реагентом, от которого можно ожидать, что он будет узнавать отдельные гены, является РНК. Пока нет прямых доказательств того, что перенос информации от ДНК к РНК обратим. Однако антимутагенное действие рибонуклеотидов [21, 71] позволяет предполагать, что в мутировании может участвовать РНК. Обратимость обмена информации ДНК \rightleftharpoons РНК подразумевалась и в хорошо обоснованной схеме репликации ДНК, предложенной Стивтом [82]. Необходим эксперимент, который показал бы перенос информации от какой-либо выделенной РНК в ДНК. Может быть, это и пытались сделать, но сообщений об этом не было.

Одним из доводов в пользу такого подхода является то, что трудно найти источник гомогенной нуклеиновой кислоты. ДНК встречается в биологических объектах в виде наборов разных молекул, как предполагается, в эквимоллярных соотношениях. Удобное исключение представляет собой замечательный маленький фаг, в котором, кажется, всего одна молекула ДНК [85]. Однако препараты РНК могут варьировать в зависимости от метаболической активности клетки. Поэтому в специализированных клетках содержание молекул РНК некоторых видов может быть настолько увеличено по сравнению с содержанием других, что их можно выделить почти в чистом виде. Очищенная РНК могла бы найти разнообразное применение, и в том числе как средство для обнаружения соответствующей ДНК, которая подразумевается нашей теорией переноса информации. Пока нет успехов в этом направлении, неоправдана и надежда на *специфический* мутагенез.

Для методологии генетики микробов решающее значение имеют адаптивные мутации, типичным примером которых является резистентность к лекарствам. Обнаружив, что адаптация связана с мутированием генов [78], мы можем использовать эти системы для обнаружения специфических генотипов в очень больших испытуемых популяциях. Интересующие нас генотипы могут возникать, как в предыдущих примерах, в результате мутирования. Эти методы используются теперь в наиболее пространственных исследованиях физиологии мутирования для точного анализа. Например, чтобы определить количество мутантов данного типа, достаточно поместить большое число бактерий на селективную среду и подсчитать выжившие колонии, которые остаются после инкубации. Таким способом можно обнаруживать столь редко возникающие мутации как одна на 10^9 делений.

Селек
эффе
мер,
откр
пита
нием
нант
шенн
мы, к
51]. З
рии с
часть
После
в кон
ра, и
клетк
[1, 46
хромо
носят
ся, то
появл
гаются
либо с
частот
генети
леталь
Пол
ген —
твержд
рые до
ный фе
может
низме,
мер, м
мой ин
субстра
влении
соответ
лучшим
сравни
Пер
штаммо
Возмож
лекция
необход
мало пр
характер
гическо
скрещив
исследо
В качес
Около ч
мом K12
и друг
или они

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

Селективное выделение определенных генотипов является также наиболее эффективным методом обнаружения генетической рекомбинации. Например, существование полового механизма у *Escherichia coli* было впервые открыто, когда в смешанной культуре двух ауксотрофных (зависящих от питания) мутантов возникли прототрофные (обеспечивающие себя питанием) рекомбинанты [35, 57, 84]. Вначале появлялся лишь один рекомбиант на миллион родительских бактерий, и селективный метод был совершенно необходим. Впоследствии были открыты более плодовитые штаммы, которые оказались крайне полезными для дальнейшего анализа [45, 51]. Этот анализ показал, что обычные многоядерные вегетативные бактерии соединяются посредством конъюгационной перемычки, через которую часть генома или весь геном мужской клетки переносится в женскую [43]. После этого гаметные клетки отделяются друг от друга. Участвовавшие в конъюгации мужские клетки выживают, так как у них еще остались ядра, и образуют неизменный клон. Участвовавшие в конъюгации женские клетки дают начало смешанному клону, содержащему рекомбинантов [1, 46]. Вольман, Жакоб и Хейс [88] недавно показали, что отцовская хромосома переходит во время оплодотворения упорядоченно и гены переносятся друг за другом. Если оплодотворение преждевременно прерывается, то хромосома может оказаться разорванной так, что у рекомбинантов появляются лишь передние маркеры. Все генетические маркеры располагаются в одной группе сцепления. Порядок маркеров можно установить, либо определяя момент их прохождения при оплодотворении, либо по частоте их совместного появления у рекомбинантов. Наконец, переносу генетических маркеров соответствует и перенос ДНК. На это указывает летальное действие радиоактивного распада P^{32} , включенного в ДНК [27].

Половая рекомбинация является одним из методов исследования связи ген — фермент. Проведенные исследования пока отрывочны, но они подтверждают представление, что ген является четками из нуклеотидов, которые должны функционировать как единое целое, чтобы образовать активный фермент [4, 15, 33, 67, 90]. Однако блокирование обменных процессов может быть результатом дефекта во вспомогательном регуляторном механизме, а не нарушения самой способности образовывать фермент. Например, многие «лактозоотрицательные» мутанты обладают измененной системой индукции фермента или дефектной пермеазной системой переноса субстрата [55, 65]. Сейчас несколько лабораторий работают над сопоставлением последовательности генетических дефектов с последовательностью соответствующих изменений в образовании фермента. Это может оказаться лучшим способом разрешения проблемы кода, пока у нас нет возможности сравнить чистую ДНК с белковым фенотипом.

Первое время опыты по рекомбинации ограничивались единственным штаммом *E. coli*, K12. По многим причинам это был благодарный объект. Возможно, основным его преимуществом является то, что накоплена коллекция из многих тысяч субштаммов, несущих различные маркеры, что необходимо для постановки генетических опытов. Однако штамм K12 мало пригоден для серологических исследований, так как он утратил характерные поверхностные антигены, являющиеся основой для серологического типирования. Как бы то ни было, очень важно знать структуру скрещиваемости энтеробактерий. Поэтому было проведено систематическое исследование способности рекомбинации различных штаммов бактерий. В качестве удобного тестера в основном использовали штамм K12 [39, 93]. Около четверти серотипических штаммов *E. coli* оплодотворяются штаммом K12 и, по крайней мере в некоторых случаях, могут оплодотворять и друг друга. Полностью ли стерильны остальные три четверти штаммов или они включают другие, близкие группы скрещиваемости (т. е. различ-

ные генетические виды), систематически не проверено, частично из-за того, что предварительно нужно провести работу по выявлению подходящих штаммов.

E. coli K12 оплодотворяет также многие штаммы *Shigella* [59]. Наконец, хотя безуспешно пытались скрестить *E. coli* с многими типами *Salmonella* и разные *Salmonella* друг с другом, Барон показал возможность скрещивания *E. coli* с единственным штаммом *Salmonella typhimurium* [3]. Это может иметь особенное значение как средство получения гибридов, которые можно использовать, чтобы связать исследования сексуальности у *E. coli* и трансдукции у *Salmonella*.

ГЕНЫ И ВИРУСЫ

Бактерии дают уникальную возможность изучать генетические взаимоотношения вирусов с их клеткой-хозяином. Не сразу стало известно еще одно замечательное свойство штамма K12. Эти бактерии содержат умеренный бактериофаг λ , который очень удобен для генетического изучения. В соответствии с предсказаниями Бернета мы ожидали, что провирус λ должен вести себя как генетическая единица. Однако результат первых же скрещиваний, проведенных доктором Эстер Ледерберг, оказался крайне удивительным: профаг сегрегировал как обычный хромосомный маркер [34]. На это совершенно недвусмысленно указывало расщепление лизогенности и чувствительности в устойчиво гетерозиготных клетках. В этих опытах обошлись без оспаривавшегося в то время полового процесса. Жизнеспособность таких гетерозиготных клеток подтверждает гипотезу, по которой лизогенность обусловлена, в частности, развитием цитоплазматического иммунитета к цитопатическому действию инфицирующего вируса в результате включения профага в бактериальную хромосому. Такой вывод вытекает также из *зиготной индукции* [26], когда оплодотворение чувствительной клетки хромосомой, несущей профаг, может вызывать размножение и созревание фага и лизис комплекса и, наоборот, внесение чувствительной хромосомы в лизогенную бактерию не приводит к такой индукции. О том, как профаг связан с хромосомой, известно так же мало, как и о высшей организации ДНК вообще, но большинство данных говорит в пользу скорее прикрепления профага сбоку, чем встраивания его внутрь хромосомы. Выделение интактной хромосомы бактерии могло бы решить этот вопрос, но до сих пор пока это не сделано.

Другая инфекционная частица, вылетевшая из нашего ящика Пандоры, определяет саму способность *E. coli* функционировать в качестве мужского партнера в процессе оплодотворения [51]. Из-за скудости воображения мы назвали эту частицу «F». В настоящее время известны два рода мужских штаммов, различающихся тем, что у одних частица F локализована в цитоплазме, а у других — на хромосоме. Штаммы F^+ , как и исходный штамм K12, высоко инфекционны по F, и если их внести в популяцию женских штаммов F^- , то они быстро превращают женские клетки в мужские. С другой стороны, у мужских клеток типа *Hfr* локализация фактора F на хромосоме зависит от случайных перемещений частицы F^+ . Различное расположение частицы F у двух типов штаммов первоначально было установлено по поведению этой частицы при скрещиваниях. Кроме того, Хирота и Ииджима [24] обнаружили, что частица F может быть элиминирована из штаммов F^+ при их обработке акридиновыми красителями. Клоны *Hfr* не чувствительны к акридин-оранжу, но когда они ревертируют в состояние F^+ , как это иногда бывает, частица F опять становится чувствительной к красителю. Эта чувствительность внехромосомного фактора F соответствует некоторым другим случаям исчезновения пластид [40]. Возможно, самым замечательным примером такого типа является побеление клеток зеленых растений при действии стрептомицина [17, 76]. Нам

неизвестен реагент, который инактивировал бы F или профаг в состоянии, связанном с хромосомой.

Вирус λ и плазмаген F имеют много сходных свойств [28, 48]. Основные же различия между ними следующие.

1. Цитопатогенность. Бактерия не может долго жить, если λ находится в цитоплазматическом состоянии. Вегетативный λ должен либо быстро перейти в состояние, связанное с хромосомой, либо быстро размножиться и лизировать бактерию. В случае F цитопатогенного действия не известно.

2. Созревание. Вегетативный λ образует белковую оболочку и созревает в инфекционную фаговую частицу. F известен лишь как внутриклеточный вегетативный элемент. Однако можно провести аналогию между оболочкой клетки F^+ и оболочкой фага.

3. Перенос. λ инфекционен, т. е. образует свободную частицу, которая может проникать в чувствительные клетки. F передается лишь при конъюгации клеток.

4. Прикрепление. У λ есть определенное место прикрепления на хромосоме бактерии. F удается обнаружить в самых разных местах хромосомы. Однако это различие может быть кажущимся. В особых случаях у F оказываются предпочтительные места прикрепления [77], и, в общем, перемещение F в другое место хромосомы легче обнаружить, чем перемещение λ .

5. Индукция. Облучение лизогенных бактерий малыми дозами ультрафиолета приводит к тому, что профаг начинает литический цикл, появляясь сначала в вегетативном состоянии, а потом и в виде зрелого фага [62]. У бактерий *Hfr* нет аналогичной реакции. Однако кинетика реверсии $Hfr \rightarrow F^+$ изучена еще недостаточно хорошо.

Еще одним примером генетической функции бактериофагов служит *трансдукция*, при которой гены переносятся от клетки к клетке при посредничестве фаговых частиц [42, 91]. На основании наших первых исследований мы сделали вывод, что бактериальные гены просто случайно захватываются нормальными фаговыми частицами [66, 83, 92]. Однако дальнейшее изучение показало, что, по-видимому, правильнее считать, что трансдуцирующая частица обладает нормальной фаговой оболочкой, но содержит неполную нуклеиновую кислоту фага. Это указывает на то, что ген может быть трансдуцирован, если рядом с ним оказывается профаг [2, 9, 60].

При изучении трансдукции особое внимание обращает на себя явление специфического спаривания гомологичных сегментов хромосом. Как бы ни включался трансдуцированный ген в геном бактерии, на некоторой стадии он должен заменить гомологичный ген в реципиентной хромосоме. При этом должен произойти обмен, как и при половой рекомбинации, новая информация не просто добавляется к старой, но и заменяет ее. Этот процесс должен включать выстраивание друг против друга двух гомологичных участков перед тем, как будет решено, какой из них сохранится. Конъюгация в этом случае еще более удивительна, чем аналогичный процесс между хромосомами, в которых ДНК находится в виде устойчивой двойной спирали. Эта спираль затем еще больше спирализуется за счет перекручивания. Спаривание при конъюгации происходит, вероятно, в результате взаимодействия продуктов генов, а не ДНК.

Наконец, споры возникают и вокруг вопроса об интеграции трансдуцированного фрагмента [41]. Существуют две конкурирующие гипотезы. Согласно одной из них происходит физическое включение фрагмента в реципиентную хромосому, согласно другой — его информация используется при репликации новой ДНК. Тот же самый спор бушует и вокруг моделей перекреста при мейозе у высших форм. Для его разрешения необходимо знание основ структуры хромосом.

РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ВИРУСОМ И ГЕНОМ

Сходство основных свойств гена и вируса делает еще более загадочными различия между ними. В соответствии с основными положениями нуклеиновой доктрины ДНК не играет никакой активной роли в своей репликации и является лишь матрицей. Следовательно, различные нуклеотидные последовательности должны были бы обладать одинаковой способностью к репликации. Но что же тогда отличает вирусную ДНК, которая осуществляет свою репликацию за счет всего обмена клетки? В случае четных Т-фагов это частично объясняется наличием необычного глюкозилированного оксиметилцитозина [12]. Однако у других вирусов, например у λ , необычных оснований не обнаружено. Более того, в состоянии профага они реплицируются координированно с ДНК бактерий. Содержат ли вирусы уникальный химический или физический структурный элемент, который до сих пор не обнаружен? Или они синтезируют преимущественно свои собственные вещества потому, что кодируют осуществляющие эти реакции ферменты?

ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЖИЗНИ

Как уже говорилось, взаимозависимость ДНК, РНК и белков является основой всей современной жизни. Вирусы, как инфекционные частицы, более просты, но зато они должны паразитировать на механизмах обмена клетки-хозяина. Какой минимум требовался от первобытного организма, который послужил исходной формой для продолжающейся и сейчас репликации ДНК? Если исходить из известного сейчас или предполагаемого механизма, то необходимы по крайней мере:

- 1) ДНК;
- 2) избыток четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов;
- 3) одна молекула белка, ДНК-полимеразы;
- 4) рибонуклеотидтрифосфаты в качестве предшественников РНК;
- 5) одна молекула белка, РНК-полимеразы;
- 6) запас 20 аминокислот

а) если таковых нет, то нужен каждый из 20 ферментов, которые катализируют конденсацию аминокислот и соответствующих фрагментов РНК, образуя эти соединения;

- 7) одна молекула белка, аминокислот-РНК-полимеразы.

В принципе, этот достаточно длинный список можно уменьшить до одного полинуклеотида, полимеризуемого одним ферментом. Однако любая схема ферментативного синтеза нуклеиновой кислоты предусматривает, что для определенных нуклеиновых кислот нужны определенные белки. Слишком уж маловероятно, чтобы, как это предполагают многие авторы, случайно появилась изолированная ДНК. Это настолько невероятно, что нужно искать другое решение проблемы происхождения жизни. Есть два типа таких решений. Первобытный организм мог бы содержать нуклеиновый цикл, но репликация нуклеиновой кислоты, хотя бы неполная, происходила без участия белка. Это означает, что в процессе эволюции отдельно появились фермент полимеразы и перенос информации от нуклеиновой кислоты к белку. Могло быть, наоборот, что ДНК в процессе эволюции образовалась из более простого полимера, возникшего в результате спонтанной конденсации. Исключительное совершенство структуры ДНК делает второе предположение вполне правдоподобным.

Нуклеопротеиновый цикл является вершиной биохимической эволюции. На его древность указывает хотя бы то, что он имеет место у всех живых существ. Так как нуклеопротеин существует уже около 10^9 лет, то, может быть, он является самым древним геохимическим признаком нашей планеты.

В настоящее время неизвестны другие самореплицирующиеся полимеры, и даже непонятно, какие полимеры могли бы самореплицироваться. Тем не менее, нуклеиновые кислоты показывают, каким основным условиям должен удовлетворять такой полимер. Он должен иметь жесткую периодическую структуру, в которую простым образом включаются звенья двух или более альтернативных типов. Он должен допускать обратную сорбцию специфических мономеров на единицах своей цепи. Затем соседствующие сорбированные мономеры должны конденсироваться, образуя полимер-реплику, который может отделяться от матрицы. В общем, конденсация может быть и спонтанной, но копия обязательно должна быть надежной. В ДНК сорбция зависит от водородных связей с молекулами оснований, прикрепленными к жесткому скелету спирали. Эту высокоспецифичную и вместе с тем тонкую конструкцию трудно было бы имитировать. Хотелось бы найти какой-нибудь более грубый механизм комплементарного взаимодействия, который мог действовать на более примитивных стадиях биологической эволюции и способствовал бы лучшему пониманию нами результатов опытов. Наиболее простым из таких механизмов является, возможно, притяжение между противоположно заряженными ионными группами, например, NH_3^+ и COO^- , которые часто встречаются в простых органических соединениях. Если изобретательность и мастерство, столь успешно продвинувшие вперед приготовление органических полимеров для практических нужд человечества, сконцентрировались бы на проблеме построения самореплицируемых полимеров такого типа, то, я думаю, для построения искусственных молекул, обладающих неотъемлемой функцией примитивной жизни, хватило бы и того, что известно органической химии уже сейчас.

ВЫВОДЫ

Экспериментальный контроль над генотипом клетки входит в сферу генетической науки. Однако нуклеиновые гены не так-то просто поддадутся экспериментальному воздействию, разве что только при воздействии реагентом, имитирующим их периодическую структуру. Специфически индуцируемые мутации, если даже они и будут осуществлены, будут включать процесс генетической рекомбинации между ДНК-мишенью и контролируемой информацией, содержащейся в реагенте. По-видимому, в ближайшем будущем будут разработаны методы для поэтапного анализа и обратной сборки нуклеиновых кислот, если удастся получать достаточно однородные препараты нуклеиновых кислот. В самом ближайшем будущем наибольшие успехи, вероятно, будут достигнуты в результате использования биологических реагентов, обеспечивающих селективность, необходимую для выделения одного полинуклеотида из бесчисленных их классов. Однако необходимо еще синтетическим путем получить модельные полимеры, которые по свойствам не уступали бы генетическим системам.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. T. F. Anderson. Recombination and Segregation in *Escherichia coli*.—Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1958, 23, 47.
2. W. Arber. Transduction des caractères Gal par le bactériophage Lambda.— Arch. Sci., Soc. Phys. Hist. Nat., Genève, 1958, 11, 259.
3. L. S. Baron, W. F. Carey and W. M. Spilman. Hybridization of Salmonella Species by Mating with *Escherichia coli*.— Abst. 7th Internat. Congr. Microbiol. (Stockholm), 1958, p. 50.
4. S. Benzer. The elementary Units of Heredity. In: «The Chemical Basis of Heredity», W. D. McElroy and B. Glass (Eds). Baltimore, 1957, p. 70. (Сб.: Химические основы наследственности. М. ИЛ, 1960, стр. 56.)
5. V. Bryson a. W. Szybalski. Microbial Drug Resistance.— Adv. Genetics, 1955, 7, 1.
6. F. M. Burnet. Biological Aspects of Infections Disease. Cambridge, 1940.
7. F. M. Burnet. Virus as Organism. Cambridge, Mass., 1945.
8. Sir MacFarlane Burnet. The Clonal Selection Theory of Immunity (Abraham Flexner Lectures, 1958). Nashville, 1959.
9. A. Campbell. Transduction and Segregation in *Escherichia coli* K-12.— Virology, 1957, 4, 366.
10. L. L. Cavalli-Sforza and J. Lederberg. Genetics of Resistance to Bacterial Inhibitors. In: «Symposium on Growth Inhibition and Chemotherapy. Internat. Congr. Microbiol. (Rome)». 1953, p. 108.
11. L. L. Cavalli-Sforza and J. Lederberg. Isolation of Preadaptive Mutants in Bacteria by Sib Selection.— Genetics, 1956, 41, 367.
12. S. S. Cohen. Molecular Basis of Parasitism of Some Bacterial Viruses.— Science, 1956, 123, 653.
13. F. H. C. Crick. The Structure of the Hereditary Material.— Scient. Am., 1954, N 151, 54.
Ф. Крик. Строение вещества наследственности. В сб.: «Физика и химия жизни». М. ИЛ, 1959, стр. 113.
14. M. Delbrück a. G. S. Stent. On the Mechanism of DNA Replication. In: «The Chemical Basis of Heredity», W. D. McElroy and B. Glass (Eds): Baltimore, 1957, p. 699. (Сб.: Химические основы наследственности. М. ИЛ, 1960, стр. 562.)
15. M. Demerec, Z. Hartman, P. E. Hartman a. oth. Genetic Studies with Bacteria.— Washington, D. C.: Carnegie Institute Publ. 612, 1956.
16. P. Doty, H. Boedtker, J. R. Fresco a. oth. Secondary Structure in Ribonucleic Acids.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 1959, 45, 482.
17. H. von Euler. Einfluss des Streptomycins auf die Chlorophyllbildung.— Kem. Arb., 1947, 9, 1.
18. E. Freese. The Difference Between Spontaneous and Base-Analogue Induced Mutations of Phage T4.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1959, 45, 622.
19. S. W. Golomb, L. R. Welch and M. Delbrück. Construction and Properties of Comma-Free Codes.— Biol. Med. Can. Vid. Selsk., 1958, 23, 1.
20. F. Griffith. The Significance of Pneumococcal Types.— J. Hyg., 1928, 27, 113.
21. F. L. Haas a. C. O. Doudney. A Relation of Nucleic Acid Synthesis to Radiation-Induced Mutation Frequency in Bacteria.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1957, 43, 871.
22. L. I. Hecht, M. L. Stephenson a. P. C. Zamecnik. Binding of Amino Acids to the End Group of a Soluble Ribonucleic Acid.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1959, 45, 505.
23. A. D. Hershey a. M. Chase. Independent Function of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage.— J. Gen. Physiol., 1951, 36, 39.
24. Y. Hirota a. T. Iijima. Acriflavine as an Effective Agent for Eliminating F-Factor in *Escherichia coli* K12.— Nature, 1957, 180, 655.
25. R. D. Hotchkiss. The Genetic Chemistry of the Pneumococcal Transformations.— Harvey Lect., 1955, 49, 124.
26. F. Jacob a. E. L. Wollman. Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *Escherichia coli*: I. L'induction par conjugaison ou induction zygotique.— Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 486.
27. F. Jacob a. E. L. Wollman. Genetic and Physical Determination of Chromosomal Segments in *Escherichia coli*.— Symp. Soc. Exper. Biol., 1958, 7, 75.
28. F. Jacob a. E. L. Wollman. Les épisomes, éléments génétiques ajoutés.— C. R. Acad. Sci., 1958, 247, 154.
29. T. J. King a. R. Briggs. Serial Transplantation of Embryonic Nuclei.— Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1956, 21, 271.

30. A. V. Kluyver a. C. B. van Niel. The Microbe's Contribution to Biology. Cambridge, Mass., 1956. (А. К л ю й в е р и К. В а н - Н и л ь. Вклад микробов в биологию. М., ИЛ, 1959.)
31. A. Kornberg. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid.—Harvey Lect., 1959, 53, 83.
32. B.C.J.G. Knight. Bacterial Nutrition.—Med. Res. Council (Brit.), Spec. Rep. Ser., N 210, 1936.
33. E. M. Lederberg. Allelic Relationships and Reverse Mutation in *Escherichia coli*.—Genetics, 1952, 37, 469.
34. E. M. Lederberg a. J. Lederberg. Genetic Studies of Lysogenicity in *Escherichia coli*.—Genetics, 1953, 38, 51.
35. J. Lederberg. Gene Recombination and Linked Segregations in *Escherichia coli*.—Genetics, 1947, 32, 505.
36. J. Lederberg. Problems in Microbial Genetics.—Heredity, 1948, 2, 145.
37. J. Lederberg. Bacterial Variation.—Ann. Rev. Microbiol., 1949, 3, 1.
38. J. Lederberg. Genetic Studies with Bacteria. In: «Genetics in the 20th Century», L. C. Dunn (ed.) N. Y., 1951, p. 263.
39. J. Lederberg. Prevalence of *Escherichia coli* Strains Exhibiting Genetic Recombination.—Science, 1951, 114, 68.
40. J. Lederberg. Cell Genetics and Hereditary Symbiosis.—Physiol. Rev., 1952, 32, 403.
41. J. Lederberg. Recombination Mechanisms in Bacteria.—J. Cell. Comp. Physiol., 1955, 45 (Suppl. 2), 75.
42. J. Lederberg. Genetic Transduction.—Am. Scientist, 1956, 44, 264.
43. J. Lederberg. Conjugal Pairing in *Escherichia coli*.—J. Bact., 1956, 71, 497.
44. J. Lederberg. Comments on Gene-Enzyme Relationship. In: «Enzymes: Units of Biological Structure and Function», O.H. Gaebler (Ed.) N.Y., 1956, p. 161.
45. J. Lederberg. Viruses, Genes and Cells.—Bact. Rev., 1957, 21, 133.
46. J. Lederberg. Sibling Recombinants in Zygote Pedigrees of *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1957, 43, 1060.
47. J. Lederberg. Genetic Approaches to Somatic Cell Variation: Summary Comment.—J. Cell. Comp. Physiol., 1958, 52 (Suppl. 1), 383.
48. J. Lederberg. Extranuclear Transmission of the F Compatibility Factor in *Escherichia coli*.—Abstr. 7th Internat. Congr. Microbiol. (Stockholm), 1958, p. 58.
49. J. Lederberg. Bacterial Reproduction.—Harvey Lect., 1959, 53, 69.
50. J. Lederberg. Genes and Antibodies.—Science, 1959, 129, 1649.
51. J. Lederberg, L. L. Cavalli and E. M. Lederberg. Sex Compatibility in *Escherichia coli*.—Genetics, 1952, 37, 720.
52. J. Lederberg and P. R. Edwards. Serotypic Recombination in *Salmonella*.—J. Immunol., 1953, 71, 232.
53. J. Lederberg and E. M. Lederberg. Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants.—J. Bact., 1952, 63, 399.
54. J. Lederberg and E. M. Lederberg. Infection and Heredity.—Symp. Soc. Growth and Develop., 1956, 14, 101.
55. J. Lederberg, E. M. Lederberg, N. D. Zinder and E. R. Lively. Recombination Analysis of Bacterial Heredity.—Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1951, 16, 413.
56. J. Lederberg and T. Iino. Phase Variation in *Salmonella*.—Genetics, 1956, 41, 743.
57. J. Lederberg and E. L. Tatum. Gene Recombination in *Escherichia coli*.—Nature, 1946, 158, 558.
58. J. Lederberg and E. L. Tatum. Sex in Bacteria: Genetic Studies, 1945—1952.—Science, 1954, 118, 169.
59. S. E. Luria and J. W. Burrous. Hybridization Between *Escherichia coli* and *Shigella*.—J. Bact., 1957, 74, 461.
60. S. E. Luria, D. K. Fraser, J. N. Adams and J. W. Burrous. Lysogenization, Transduction, and Genetic Recombination in Bacteria.—Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1958, 23, 71.
61. A. Lwoff. Les facteurs de croissance pour les microorganismes.—Ann. Inst. Pasteur, 1938, 61, 580.
62. A. Lwoff, L. Siminovitch and N. Kjeldgaard. Induction de la production de bactériophages chez une bactérie lysogène.—Ann. Inst. Pasteur, 1950, 79, 815.
63. W. D. McElroy a. B. Glass (Eds). The Chemical Basis of Heredity, Baltimore, 1957. (Сб.: Химические основы наследственности. М., ИЛ, 1960.)

64. M. Meselson a. F. W. Stahl. The Replication of DNA in *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 1958, 44, 671.
65. J. Monod. Remarks on the Mechanism of Enzyme Induction. In: «Enzymes: Units of Biological Structure and Function», O.H. Gaebler (ed.). N. Y. 1956, p. 7.
66. M. L. Morse, E. M. Lederberg and J. Lederberg. Transduction in *Escherichia coli* K-12.—Genetics, 1956, 41, 142.
67. M. L. Morse, E. M. Lederberg a. J. Lederberg. Transductional Heterogenotes in *Escherichia coli*.—Genetics, 1956, 41, 758.
68. H. J. Muller. The Production of Mutations. Les Prix Nobel en 1946. Stockholm, 1948, p. 257. (См. Приложение III).
69. E. Nagel. The Meaning of Reduction in Natural Sciences. In: «Science and Civilization», R. C. Stauffer (Ed.). Madison, 1949, p. 99.
70. D. L. Nanney. Epigenetic Control Systems.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1958, 44, 712.
71. A. Novick. Mutagens and Antimutagens.—Brookhaven Symposia in Biology. Washington, 1956, 8 (Mutation), 201.
72. A. Novick and A. McCoy. Quasi-Genetic Regulation of Enzyme Level. In: Physiological Adaptation. Washington, 1958, p. 140.
73. L. Pauling. Molecular Structure and Intermolecular Forces. In: «The Specificity of Serological Reactions», K. Landsteiner (Ed.). Cambridge, Mass., 1945, p. 275.
74. N. W. Pirie. Some Aspects of the Origins of Life Considered in the Light of the Moscow International Symposium.—ISCU Rev., 1959, 1, 40.
75. J. Preiss, P. Berg, E. J. Ofengand, F. H. Bergmann a. M. Dieckmann. The Chemical Nature of the RNA — Amino Acid Compound Formed by Amino Acid-Activating Enzymes.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1959, 45, 319.
76. L. Provasoli, S. H. Hutner a. I. J. Pintner. Destruction of Chloroplasts by Streptomycin.—Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1951, 16, 113.
77. A. A. Richter. Determinants of Mating Type in *Escherichia coli*, Ph. D. Dissertation, University of Wisconsin (University Microfilm, Ann. Arbor, Mich.), 1959.
78. F. J. Ryan a. J. Lederberg. Reverse-Mutation in Leucineless *Neurospora*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1946, 32, 163.
79. F. Sanger. Les Prix Nobel en 1958, Stockholm, 1959.
80. E. Schrödinger. What is Life?, Cambridge, 1944. (Э. Шредингер. Что такое жизнь? М., ИЛ, 1947.)
81. S. Spiegelman, C. C. Lindegren a. G. Lindegren. Maintenance and Increase of a Genetic Character by a Substrate-Cytoplasmic Interaction in the Absence of the Specific Gene.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1945, 31, 95.
82. G. S. Stent. Mating in the Reproduction of Bacterial Viruses.—Adv. Virus Research, 1958, 5, 95.
83. B. A. D. S. Stocker, N. D. Zinder a. J. Lederberg. Transduction of Flagellar Characters in *Salmonella*.—J. Gen. Microbiol., 1953, 9, 410.
84. E. L. Tatum a. J. Lederberg. Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*.—J. Bact., 1947, 53, 673.
85. I. Tessman. Some Unusual Properties of the Nucleic Acid in Bacteriophages S13 and X174.—Virology, 1959, 7, 263.
86. Sir Alexander Todd. Synthesis in the Study of Nucleotides. Les Prix Nobel en 1957. Stockholm, 1958, p. 119.
87. J. D. Watson a. F. H. C. Crick. The Structure of DNA.—Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1953, 23, 123.
88. E. L. Wollman, F. Jacob a. W. Hayes. Conjugation and Genetic Recombination in *Escherichia coli* K12.—Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 1956, 21, 141.
89. G. E. W. Wolstenholme a. C. M. O'Connor (Eds). CIBA Foundation Symposium on Drug Resistance in Microorganisms. London, 1957.
90. C. Yanofsky a. I. P. Crawford. Effects of Deletions, Point Mutations, Suppressors of Mutations and Reversions on the Two Components of Tryptophane Synthetase of *Escherichia coli*.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1959, 45.
91. N. D. Zinder Bacterial Transduction.—J. Cell. Comp. Physiol., 1955, 45 (Suppl. 2), 23.
92. N. D. Zinder and J. Lederberg. Genetic Exchange in *Salmonella*.—J. Bact., 1952, 64, 679.
93. F. Ørskov and I. Ørskov. (Неопубликованные наблюдения).

ПРО
Я п
обр
Это
фаг
о ко
нуж
ном
а Д
(
лабо
Джо
мож
разг
в би
лемо
ной
лиру
проб
озна
тика
ской
скол
Пол
глав
жене
что
ДНК
ким
В
спир
прав
Нахо
жетс
инер
П
но и
сдела
того,
понят
среди
гичес
не от
нансв
прави
позна
ности

Приложение IX

РОЛЬ РНК В СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

Дж. Д. УОТСОН

Нобелевская лекция, 1962 г.

ПРОЛОГ

Я прибыл в Кембридж осенью 1951 г. Хотя до этого я увлекался главным образом генетикой, Луриа устроил меня на работу к Джону Кендрию. Это было время, когда, разочаровавшись в исследованиях, касающихся фагов, я захотел побольше узнать о подлинных структурах молекул, о которых генетики говорили с такой страстью. В то же время Джон нуждался в сотруднике и надеялся, что я помогу ему в рентгеноструктурном исследовании миоглобина. Так я стал сотрудником Колледжа Клер, а Джон — моим руководителем.

Однако почти немедленно после того, как я попал в Кевендишскую лабораторию, я понял, что никогда не смогу стать хорошим помощником Джону. Ведь тогда уже начались наши беседы с Френсисом Криком. Возможно, что и без Френсиса миоглобин мне бы быстро наскучил. Но после разговоров с Френсисом моя судьба была решена. Мы быстро поняли, что в биологии мы намереваемся идти одинаковым путем. Центральной проблемой биологии был ген и контролируемый им метаболизм клетки. Главной задачей было понять репликацию гена и путь, которым гены контролируют синтез белков. Было очевидно, что приступить к решению этих проблем можно лишь после того, как станет ясной структура гена. А это означало выяснение структуры ДНК. В то время эта цель казалась генетикам недостижимой. А мы, сидя в нашей темной, холодной Кевендишской лаборатории, думали, что эту работу можно сделать, причем за несколько месяцев. Наш оптимизм отчасти был основан на успехе Лайнуса Полинга, пришедшего к выводу о существовании α -спирали [1], исходя, главным образом, из законов теоретической химии, так убедительно изложенных в его классической «Природе химической связи». Мы знали также, что Морис Уилкинс располагал кристаллоподобными рентгенограммами ДНК. Следовательно ДНК должна иметь упорядоченную структуру; таким образом, оставалось кому-то получить ответ.

В течение последующих 18 месяцев, до тех пор, пока не прояснилась двуспиральная структура ДНК, мы часто обсуждали неизбежность того, что правильная структура должна обладать способностью саморепликации. Находясь в пессимистическом настроении, мы часто беспокоились, не окажется ли истинная структура «неинтересной»; не будет ли она чем-то инертным, вроде коллагена.

Поэтому открытие двойной спирали [2] принесло нам не только радость, но и облегчение. Это было невероятно интересно и сразу позволило нам сделать важное предположение о механизме дупликации генов [3]. Кроме того, наша схема репликации ДНК предусматривала участие вполне понятных обычных химических сил. Ранее некоторые физики-теоретики, среди которых был Паскаль Иордан [4], предполагали, что многие биологические явления (особенно репликации генов) могут базироваться на еще не открытых силах «дальнего действия», возникающих вследствие резонансных квантовомеханических взаимодействий. Полингу [5] очень не нравилось это предположение, и он твердо настаивал на том, что уже известные силы «ближнего действия» между комплементарными поверхностями могут быть основой биологической репликации.

Установление структуры ДНК подтвердило наше мнение о правильности аргументов Полинга о том, что силы «дальнего действия», или любые другие мистические силы подобного рода, могут и не участвовать в синтезе белка. Однако одно выяснение структуры ДНК не давало в то время никакого представления о процессе репликации белков. Тем не менее, это нас не тревожило, так как предполагалось, что в синтезе белка участвует не ДНК, а РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Идея о том, что РНК участвует в синтезе белка, восходит к выполненным 20 лет назад работам Браше и Касперсона [6] — пионеров в этой области. Они показали, что клетки, активно синтезирующие белок, богаты РНК. Позднее, когда стали доступны радиоактивные аминокислоты, это предположение было подкреплено сведениями о том, что местом синтеза белка в клетке служат микросомы [7], в значительной степени состоящие из сферических частиц, богатых РНК. Позднейшие эксперименты показали [8], что именно эти рибонуклеопротеидные частицы (теперь для удобства называемые рибосомами), а не липопротеидные мембраны, к которым они обычно присоединены, и являются тем местом, где образуются полипептидные связи. Большинство рибосом находится в цитоплазме; соответственно, большинство белков синтезируется без прямого вмешательства ДНК, локализованной в ядрах. Таким образом, появилась возможность того, что заложенная в ДНК генетическая специфичность вначале переносится на РНК-посредники, которые затем служат матрицами, контролирующими сборку аминокислот в белки.

Когда в 1953 г. стала известна структура ДНК, мы смогли сформулировать эту гипотезу более точно. Тогда мы представляли себе, что генетическая специфичность ДНК определяется последовательностью комплементарных оснований двух ее перекрученных цепей. Одна из этих комплементарных цепей (или они обе) служит матрицей для специфических молекул РНК, генетическая информация которой опять-таки заключается в специфической последовательности оснований. Этим молекулам РНК должна быть тогда присуща трехмерная конфигурация с поверхностями, комплементарными боковым группам 20 различных аминокислот.

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РНК И РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

Прямой путь проверки этой гипотезы — установление структуры РНК. Уже в 1952 г. я сделал несколько предварительных рентгенограмм РНК. Однако они были очень расплывчатыми, и это продолжалось до тех пор, пока я не вернулся в США осенью 1953 г., чтобы начать серьезное рентгеноструктурное исследование РНК. Находясь в Калифорнийском технологическом институте, мы вместе с Александром Ричем получили образцы РНК из различных организмов. Сначала нас [9] очень обнадежило то, что все образцы РНК, независимо от их происхождения, давали сходные дифракционные картины. Таким образом, существовала единая структура РНК. Это позволяло нам надеяться на то, что когда структура РНК выяснится, она может оказаться интересной. Уже первые наши фотографии показали систематическое отсутствие меридианальных рефлексов, что позволяло предположить спиральную структуру. Но несмотря на большие усилия, направленные на то, чтобы получить нативные, неразрушенные высокомолекулярные образцы РНК, удовлетворительные рентгенограммы получены не были. Рефлексы всегда были расплывчатыми, не было обнаружено каких-либо доказательств существования кристаллической

структуры. Хотя и имелось заметное сходство с рентгенограммами ДНК, у нас не было веских доказательств для того, чтобы думать, что это сходство вытекает из подобной спиральной конфигурации. Оставалась неразрешенной проблема, состоит ли молекула РНК из одной или из нескольких нитей.

Затем мы рассмотрели возможность того, что РНК может иметь регулярную структуру только в комбинации с белком. В то время (1955 г.) не было никаких сколько-нибудь надежных данных о существовании свободной от белков РНК. Считалось, что любая РНК либо существует как компонент вируса, либо комбинируется с белком в рибонуклеопротеидные частицы. Таким образом, казалось логичным сосредоточить внимание на изучении рибонуклеопротеидных частиц (рибосом), так как на их поверхностях синтезировались белки. Мы надеялись, что установление их структуры открыло бы долгожданные впадины, специфичные для аминокислот.

В те времена мы были поражены морфологическим сходством рибосом с мелкими РНК-содержащими вирусами типа вируса желтой мозаики репы или полиомиелита. К тому времени (1955—1956) я вернулся в Кембридж, чтобы вместе с Криком закончить формулирование некоторых общих принципов структуры вирусов [10]. Наша основная идея заключалась в том, что ограниченное содержание нуклеиновой кислоты в вирусах строго лимитирует число аминокислот, которое они могут кодировать. Отсюда вывод — белковая оболочка вируса не может быть построена из очень большого числа различных белковых молекул. Напротив, она должна быть построена из ряда идентичных, мелких, регулярно расположенных субъединиц. Эти идеи уже подтвердились на примере палочкообразного вируса табачной мозаики и мы были очень довольны, когда Д. Каспар [11], работавший тогда с нами в Кевендишской лаборатории, получил несколько прекрасных рентгенограмм кристаллов вируса карликовой кустистости и таким образом распространил экспериментальное подтверждение этих идей на сферические вирусы.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ РИБОСОМ

В то время не было сделано почти ничего по исследованию структуры рибосом. В основном они были охарактеризованы по константам седиментации: у высших организмов [12] порядка 70s—80s, тогда как у бактерий [13] они меньше и двух размеров (30s и 50s). Поскольку бактериальные рибосомы меньше, они казались более удобным объектом для изучения структуры. Итак, когда в 1956 г. Альфред Тиссер и я приехали в Гарвардскую биологическую лабораторию, мы начали исследование рибосом подробно изученных бактерий *E. coli*. Мы надеялись, что их структура проявит сходство с мелкими сферическими РНК-содержащими вирусами. Тогда бы мы имели хорошие шансы закристаллизовать их и, в конечном счете, применить методы дифракции рентгеновых лучей, чтобы выяснить их трехмерную структуру.

Субъединицы рибосом

Однако уже в начале наших гарвардских экспериментов стало очевидно, что структура рибосом может быть более сложной, чем структура РНК-содержащих вирусов. В зависимости от концентрации дивалентных катионов (Mg^{++} во всех опытах) было обнаружено 4 вида рибосом *E. coli*, которые характеризовались константами седиментации в 30s, 50s, 70s и 100s. Наши первые опыты в $10^{-4} M Mg^{++}$ выявили 30s и 50s-рибосомы. В то же самое время в Вашингтоне, в институте Карнеги Болтон с сотрудниками [14], применив высокую концентрацию Mg^{++} , обнаружил более быстро оседавшие рибосомы и предположил, что они наблюдали агрегаты оседлывающие рибосомы и предположил, что они наблюдали агрегаты

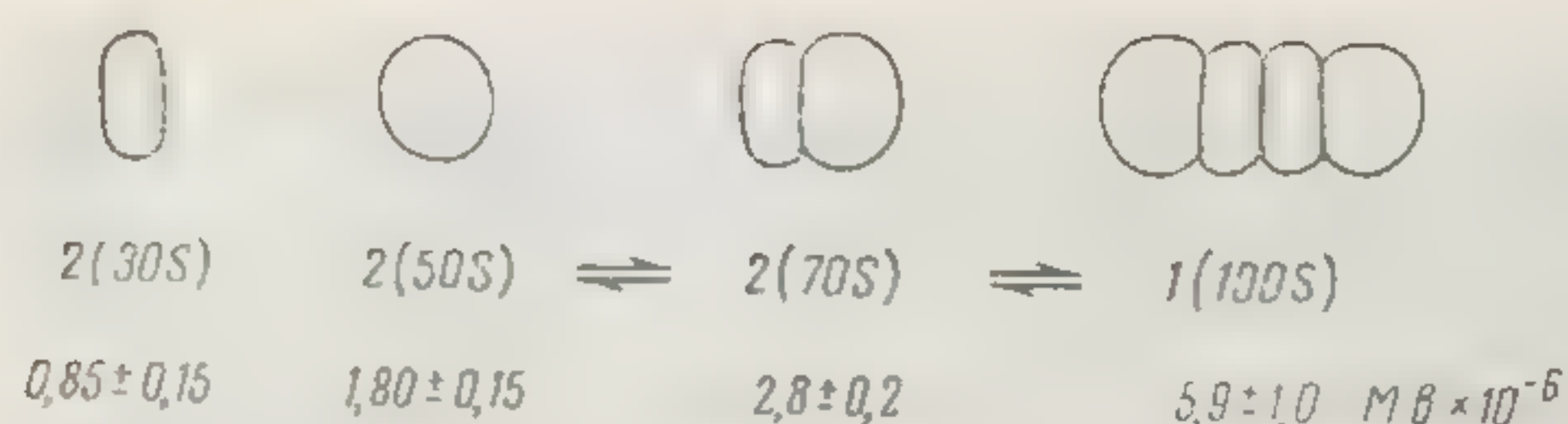


РИС. IX-1.

Схематическое изображение субъединиц рибосом *E. coli* и продуктов их агрегации.

(Данные о молекулярном весе взяты из работы Тисьера и др. [15]). Все частицы состоят из 64% РНК и 36% белка

более мелких частиц. Вскоре после этого наши опыты [15] позволили обнаружить, что при увеличении концентрации Mg^{++} одна 30s-частица и одна 50s-частица могут объединиться, образуя 70s-рибосому. При еще более высоких концентрациях Mg^{++} две 70s-рибосомы димеризуются, образуя 100s-рибосому (рис. 1 и 2).

Рибосомы любого организма имеют сходное строение из субъединиц. Как и в случае рибосом *E. coli*, концентрация дивалентных катионов определяет, какие существуют рибосомы. Для того чтобы агрегировать в частицы большего размера, бактериальные рибосомы требуют более высоких концентраций Mg^{++} . При понижении концентрации Mg^{++} они гораздо быстрее распадаются на 30s и 50s-субъединицы. Когда используют рибосомы млекопитающих, для быстрого распада 80s-рибосом (гомологических бактериальным 70s-рибосом) на их 40s- и 60s-субъединицы зачастую удобно добавить какой-либо хелатный агент [16]. Бактериальные рибосомы



РИС. IX-2.

Электронная микрофотография негативно контрастированных рибосом *E. coli* (Хаксли и Зьюбе [15]).

Преобладают частицы 2 видов: (1) 70 s, состоящие из двух субъединиц неравного размера, и (2) 100 s, состоящие из 2×70 s-рибосом, соединенных друг с другом через более мелкие субъединицы (30s)

в действительности ненамного меньше рибосом млекопитающих. Просто в бактериальных системах легче наблюдать более мелкие субъединицы.

Рибосомная РНК

Уже в 1958 г. было несколько сообщений [17] о том, что рибосомная РНК высших организмов седиментирует как два отдельных компонента (18s и 28s). Мы предположили, что меньшая молекула вероятнее всего происходит от меньшей субъединицы рибосом, тогда как быстрее седиментирующая РНК происходит от большей субъединицы. Эксперименты Курланда [18] быстро подтвердили это предположение. Было найдено, что 30s рибосома *E. coli* содержит одну цепь РНК (16s) с молекулярным весом $5,5 \times 10^5$. Соответственно, большая молекула (23s) с молекулярным весом $1,40 \times 10^6$ была обнаружена в большинстве 50s рибосом (рис. 3).

Белки рибосом

Анализ белкового компонента выявил гораздо более сложную картину. В противоположность мелким РНК-содержащим вирусам, белковая оболочка которых строится из большого числа регулярно расположенных идентичных белковых молекул, каждая рибосома, вероятно, содержит большое количество различных полипептидных цепей. Сначала, когда Уоллер и Харрис проанализировали рибосомы *E. coli* в отношении NH_2 -концевых аминокислот, наши результаты позволили предположить существование простого ответа. В значительных количествах присутствовали только аланин и метионин, серина было несколько меньше. Это позволяло надеяться на то, что для построения рибосом используется только несколько видов белковых молекул. Однако дальнейшие опыты Уоллера [19] давали возможность предположить обратное. Когда фракции рибосомного белка были проанализированы с помощью электрофореза на крахмальном геле, проявилось более 20 отдельных полос. Почти все белки при pH 7 двигались к аноду, что подтверждает положительный заряд общего рибосомного белка [20]. Различные контрольные опыты свидетельствуют о том, что эти фракции представляют собой отдельные полипептидные цепи, а не агрегаты нескольких основных субъединиц. Кроме того, электрофореграмма белков 30s-рибосом коренным образом отличалась от электрофореграммы белков 50s-рибосом.

Все еще нет строгих доказательств того, что каждая 70s-рибосома содержит все различные белковые компоненты, найденные в общей популяции. Однако все попытки Уоллера хроматографически разделить интактные рибосомы на фракции, дающие различные электрофоретические картины (в крахмальном геле), пока что не увенчались успехом. Молекулярный вес всего белкового компонента 70s-рибосомы составляет около 9×10^5 . Анализ концевых групп позволяет допустить средний молекулярный вес рибосомного белка около 30 000; следовательно, для построения 50s-рибосом используется приблизительно 20 полипептидных цепей, а 30s-

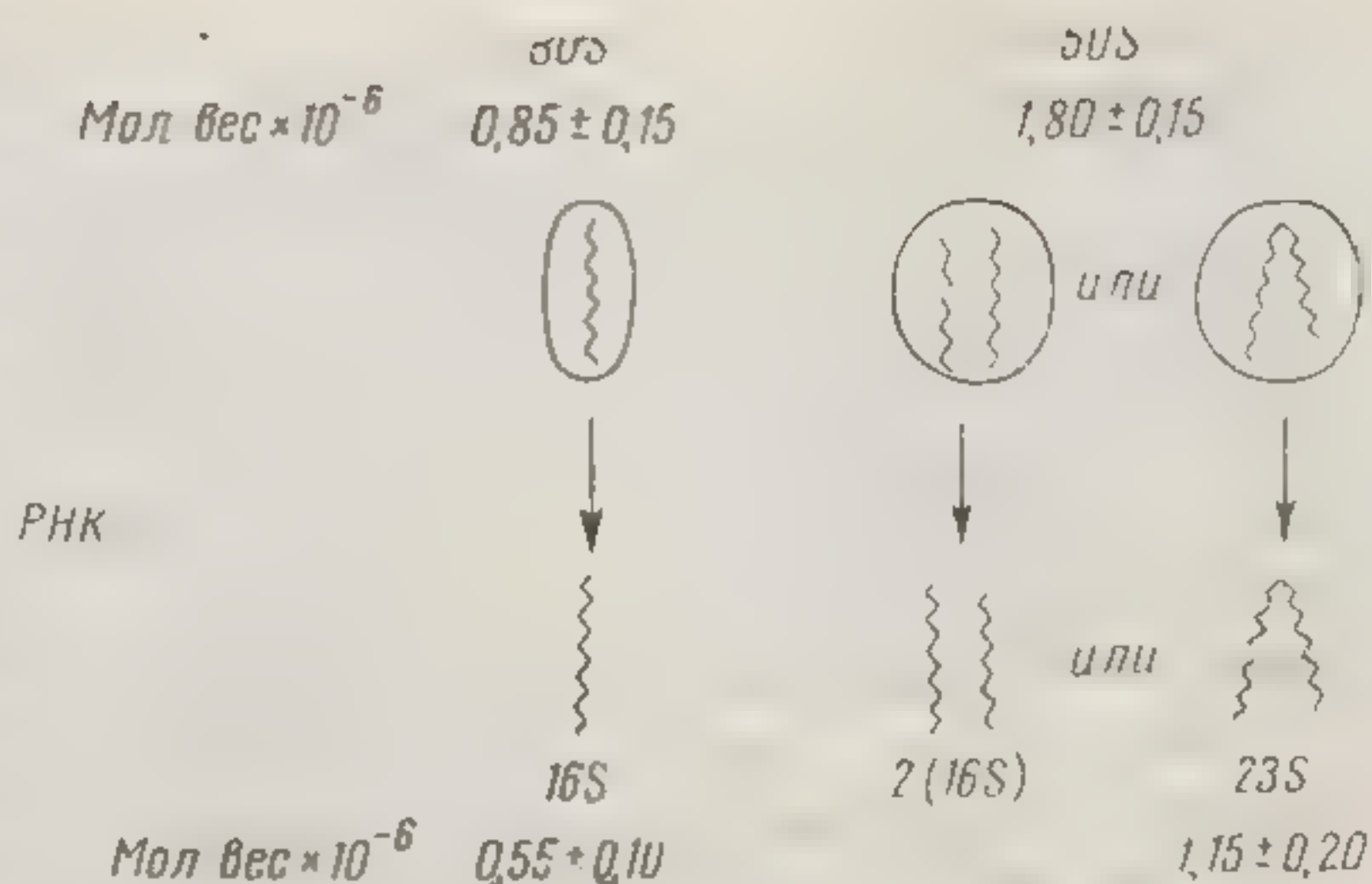


РИС. 1х-3.

Молекулярный вес РНК, выделенной из рибосом *E. coli*.

(Изображение схематично и не представляет собой истинной конформации рибосомной РНК)

рибосом — около 10. Возможно, все полипептидные цепи 30s-частиц различны. Уоллер уже имеет данные о десяти отдельных компонентах в 30s-рибосомах, а невозможность наблюдать большее число белковых фракций в 50s-рибосомах, возможно, просто означает, что несколько полипептидных цепей имеют одинаковую электрофоретическую подвижность.

Мы полагаем, что все эти белки играют прежде всего структурную роль, т. е. они не являются ферментами, и их главная функция — удерживать рибосомную РНК и необходимые промежуточные соединения в строго определенном расположении при образовании пептидной связи. Кроме того, с рибосомами тесно связан ряд ферментов, функция которых все еще не ясна. Одним из них является бактериальная рибонуклеаза, латентная форма которой, как обнаружил Элсон [21], специфически связана с 30s-рибосомами. Пока рибосомы не разрушены, в них нет рибонуклеазной активности. Спар [22] в нашей лаборатории очистил этот фермент, показал его специфичность и на основании измерения его удельной активности показал, что на двадцать 30 s-частиц приходится меньше одной молекулы этого фермента. Если бы этот фермент присутствовал в активной форме, то он, очевидно, вызвал бы быструю гибель клетки-хозяина. Таким образом, понятно его присутствие в латентной форме. Однако вопрос о том, почему он связан с рибосомами, все еще остается открытым.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ВЕЩЕСТВА ПРИ СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

Вначале наши эксперименты почти не были связаны с усилиями биохимиков. В то время объекты наших исследований казались очень различными. Энзимологи надеялись найти промежуточные соединения и ферменты, нужные для образования пептидной связи. Напротив, те из нас, которые имели генетическую ориентацию, хотели увидеть матрицу и открыть, каким образом она различает определенную аминокислоту. Однако очень скоро эти различные пути сошлись вместе, отчасти благодаря важным открытиям о природе промежуточных соединений аминокислот, а отчасти благодаря острому уму Крика.

Биохимический прогресс явился результатом работы, выполненной в лаборатории Пола Замечника в Главном Массачусетском госпитале. Там была разработана воспроизводимая бесклеточная система [23], содержащая рибосомы, факторы из центрифугата и АТФ, которая включала аминокислоты в белки. Используя эту систему, Хогленд сделал два важных открытия. Во-первых, он [24] показал, что аминокислоты сначала активируются АТФ, образуя богатые энергией комплексы аминокислота — АМФ. Во-вторых, он показал [25], что активированные аминокислоты затем переносятся на молекулы РНК с низким молекулярным весом (сейчас ее называют растворимой, или транспортной, РНК) опять-таки в активированной форме. Эти соединения (аминоацил-тРНК) затем функционируют как непосредственные промежуточные соединения при образовании пептидной связи (рис. 4).

Еще до открытия Хогленда было очевидно, что аминокислота должна активироваться. Однако второе открытие Хогленда (1956 г.) об участии до сих пор неизвестного вида РНК (тРНК) было неожиданным почти для всех. За несколько лет до этого (1954 г.) Лесли Оргел и я тщетно пытались построить гипотетические структуры РНК, которые содержали бы неровности, по форме комплементарные боковым группам аминокислот. Однако эти попытки не увенчались успехом. Скелет РНК невозможно было уложить так, чтобы возникли эти специфические неровности, и, даже если пренебречь скелетом, нам не удалось установить критерия, по которому можно было бы найти различия между валином и изолейцином. В это же самое время (1955 г.) Крик находился в таком же затруднительном

РИС. 1
Ферме
Стадии
вующих

полож
[26],
дая ам
молек
водоро
новым
мере 2
амино
кие м
экспер
устано
данной
Крика
для си
специф
тРНК-

УЧАСТ
В СИНТ

В беск
ного М
исполь
показа
факт к
будут
более о
нозы е
эффект
опыты
иллюст
должае
В течен
ляет 1—
бождает
Беск
центра
рибосом
рибосом
более ус
ные экс

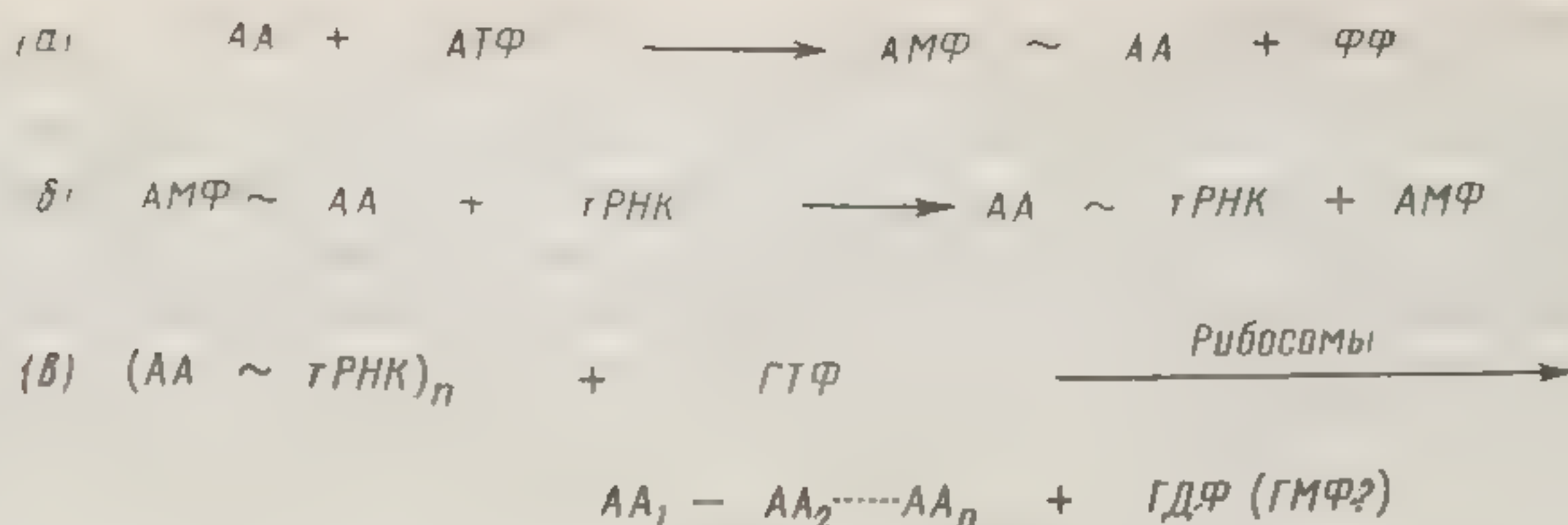


РИС. IX-4.

Ферментативные стадии образования пептидной связи.

Стадии (a) и (b) катализируются каждая одним ферментом. Число ферментов, участвующих на стадии (a), неизвестно

положении и предлагал коренное решение этого парадокса. Он предположил [26], что аминокислоты не комбинируются с матрицей. Вместо этого каждая аминокислота должна комбинироваться со специфической адапторной молекулой, способной избирательно взаимодействовать с поверхностными водородными связями, которые обеспечиваются пуриновыми и пиримидиновыми основаниями РНК. Эта схема требует существования по крайней мере 20 различных адапторов, каждый из которых специфичен для данной аминокислоты. Для роли адапторов очень хорошо подходили специфические молекулы РНК. Вскоре после открытия тРНК Хоглендом многие эксперименты, особенно самого Хогленда и Пола Берга [27], позволили установить, что молекулы тРНК действительно специфичны для каждой данной аминокислоты. Таким образом, следуя направлению рассуждений Крика, стало возможным представить дело так, что рибосомная матрица для синтеза белка комбинируется не с аминокислотными радикалами, а со специфической группой оснований рибонуклеиновой части аминоацил-тРНК-предшественника.

УЧАСТИЕ АКТИВНЫХ РИБОСОМ В СИНТЕЗЕ БЕЛКА

В бесклеточной системе, разработанной группой исследователей Главного Массачусетского госпиталя, синтез белка шел очень медленно. Только используя радиоактивные аминокислоты, эти авторы смогли убедительно показать, что аминокислоты включаются в белки. Первоначально этот факт казался тривиальным, и имела большая надежда на то, что, когда будут найдены лучшие экспериментальные условия, будет происходить более ощутимый синтез белка. Однако, несмотря на оптимистические прогнозы нескольких лабораторий, никаких действительных улучшений эффективности бесклеточного синтеза белка не последовало. Некоторые опыты (1959 г.) Тисьера и Шлезингера [28] с экстрактами *E. coli* хорошо иллюстрируют эту ситуацию. Синтез в бесклеточной системе при 30° продолжается линейно 5—10 минут и затем постепенно останавливается. В течение этого времени количество вновь синтезированного белка составляет 1—3 мкг белка на 1 мг рибосом. Из этого количества одна треть освобождается из рибосом, остальная остается связанной с ними.

Бесклеточный синтез белка в экстрактах *E. coli* требует высокой концентрации Mg^{++} ($\approx 10^{-2} M$), которая благоприятствует образованию 70s-рибосом из их 30s- и 50s-субъединиц. После включения аминокислот эти рибосомы, содержащие зарождающиеся полипептидные цепи, становятся более устойчивыми к разрушению на 30s и 50s-рибосомы. Если бесклеточные экстракты (после синтеза) недолго диализовать против $10^{-4} M Mg^{++}$,

то освобождается около 80—90% 30s и 50s-рибосом, однако остается 10—20% от исходных 70s-рибосом, и именно в этих рибосомах локализована большая часть возникшего белка. Прежде всего это позволяет предположить, что синтез белка происходит на 70s-рибосомах, а не на свободных 30s и 50s-рибосомах. Во-вторых, в обычно изучаемом экстракте *E. coli* функционирует только малая фракция рибосом. Тисьер и Шлезингер назвали такие частицы «активными рибосомами» и предположили, что они содержат функциональный компонент, отсутствующий в других рибосомах.

Каждая активная рибосома синтезирует белок со средним молекулярным весом от 15 000 до 50 000. Этот размер укладывается в пределы размеров природных полипептидных цепей. Таким образом, хотя мы и испытывали чувство неудовлетворенности слабым общим синтезом, происходило все же образование некоторого количества целых белковых молекул. Это толкнуло нас на поиски синтеза β -галактозидазы. Однако, несмотря на большие усилия, сделать в то время так ничего и не удалось [29].

Первые исследования (1959 г.) включения аминокислот в экстрактах *E. coli* поставили перед нами другой важный вопрос. Добавление малых количеств очищенной дезоксирибонуклеазы снижало синтез белка на 20—40% по сравнению с необработанными экстрактами [28]. Это было совершенно неожиданным, так как позволяло допустить, что в этих широко изучаемых бактериальных экстрактах функционирует высокополимерная ДНК. Однако, поскольку основной синтез белка происходит после разрушения ДНК дезоксирибонуклеазой, сама ДНК не должна прямо участвовать в образовании пептидной связи. Вместо прямого участия ДНК, это позволило допустить, что в необработанных ДНКазой экстрактах происходит синтез новой матричной РНК на ДНК. Если бы это предположение оказалось верным, то возникла бы ранее серьезно не рассматривавшаяся биохимики возможность нестабильности самих РНК-матриц; эта нестабильность РНК является тем фактором, который лимитирует бесклеточный синтез белка.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ РИБОСОМНОЙ РНК

Во всех наших прежних опытах с рибосомами мы считали рибосомную РНК матрицей. Существовали многочисленные данные о том, что рибосомные белки синтезируются на рибосомах, а поскольку матрицей должна быть РНК, то естественно было допустить, что это — рибосомная РНК. Согласно этой гипотезе, рибосомная РНК представляет собой набор молекул с различной последовательностью оснований, синтезирующихся на функционирующих участках ДНК хромосомы. После синтеза она комбинируется с основными рибосомными белками, образуя рибосомы. Таким образом, мы считали, что морфологическая идентичность рибосом, по-видимому, представляет собой следствие того, что набор очень большого числа генетически различающихся частиц маскируется подобием их белкового компонента.

В то время имелись многообещающие данные о том, что молекулы рибосомной РНК стабильны в растущих бактериях. Еще в 1949 г. опыты показали, что предшественники РНК, раз включившись в РНК, остаются в ней. Тогда не были известны различия между рибосомной и растворимой РНК, но более поздние эксперименты группы, изучающей рибосомы в Вашингтонском институте Карнеги и в Гарвардском университете, указали на одинаковую стабильность обеих фракций РНК. Однако в этих опытах не проследили судьбу единичных молекул, и оставалась возможность того, что какая-то специальная особенность позволяет цепям рибосомной РНК разрушаться до фрагментов, которые предпочтительно реутилизируются

при создании новых молекул рибосомной РНК. Однако Давери и Мезельсон [30] исключили эту возможность, выращивая рибосомную РНК в тяжелой среде (C^{13} , N^{15}), после чего следовало несколько ростовых генераций в легкой среде (C^{12} , N^{14}). Затем они разделили легкую и тяжелую рибосомные РНК в градиенте плотности формиата цезия и показали, что тяжелые молекулы остаются совершенно целыми в течение по крайней мере двух генераций. Если допустить, что рибосомы генетически специфичны, то этот результат позволяет предсказать, что матрицы для белка в растущих бактериях должны существовать неограниченно долго.

ОПЫТЫ, СВИДЕТЕЛЬСТВУЮЩИЕ О НЕСТАБИЛЬНОСТИ МАТРИЦ ДЛЯ БЕЛКА

Уже ко времени экспериментов Давери и Мезельсона (1959) главным образом в Институте Пастера начали накапливаться данные о том, что некоторые (если не все) бактериальные матрицы нестабильны. Время их жизни составляет всего несколько процентов от времени генерации. Ни один из этих экспериментов сам по себе не был убедительным. Каждый мог быть интерпретирован иначе, с сохранением концепции стабильности матриц. Только взятые вместе, они доказывают определенное положение.

Эти опыты были нескольких типов. В одном из них изучали эффект внезапного введения или разрушения специфических молекул ДНК. Внезапное введение достигалось тем, что при конъюгации вводили специфический район хромосомы самца-донора, который отсутствовал у реципиентных самок. Одновременно измеряли способность мужского гена функционировать в женской клетке (образовывать ферментативно-активный белок). Рилей, Парди, Жакоб и Моно [31] сделали поразительное открытие, заключающееся в том, что β -галактозидаза, генетически определяемая специфическим мужским геном, начинает синтезироваться с максимальной скоростью через несколько минут после переноса гена. Таким образом, устойчивое состояние числа матриц для β -галактозидазы достигается почти сразу после переноса гена. Напротив, когда хромосома *E. coli* была инактивирована распадом атомов P^{32} , включенных в ДНК, они через несколько минут наблюдали остановку образования активного фермента. Следовательно, рибосомные матрицы не могут функционировать без сопутствующего функционирования ДНК.

В то же время Франк Гро открыл [32], что рост бактерий на 5-фторурациле вызывает появление ненормальных белков, у которых, наиболее вероятно, изменена последовательность аминокислот. 5-фторурацил легко включается в бактериальную РНК, и его присутствие в РНК-матрицах может резко увеличивать уровень ошибок. Более неожиданным был тот факт, что после добавления 5-фторурацила образование всех нормальных белков прекращается в течение нескольких минут. Этот факт является еще одним свидетельством против существования какой бы то ни было стабильной матрицы.

НЕСТАБИЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЫ РНК В КЛЕТКАХ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ФАГОМ

Сначала считалось, что в клетках, зараженных фагом Т2, не происходит синтеза РНК. Лишь в 1952 г. Херши [33] наблюдал, что новые молекулы РНК в зараженных бактериях синтезируются с высокой скоростью. Однако их накопления не происходит, так как одновременно наблюдается их быстрое разрушение. Удивительно, что почти все игнорировали это открытие. Отчасти эта оплошность была допущена вследствие доминировавшего

тогда представления о том, что метаболизм клеток, зараженных вирусом, может качественно отличаться от метаболизма незараженных клеток.

Первыми, кто серьезно отнесся к нестабильной РНК, были Волкин и Астрахан [34] (1956 г.). Они определили ее состав и нашли, что он отличается от состава оснований РНК незараженных клеток *E. coli* и имеет много общего с составом ДНК инфекционного вируса, что позволило предположить, что эта РНК синтезировалась на Т2-ДНК матрицах. Кроме того, что наиболее важно, эта фракция РНК, должно быть, является матрицей для синтеза фагоспецифичных белков. Как только мы принимаем, что РНК участвует в синтезе фагоспецифичных белков, из этого обязательно следует, что ДНК-подобная РНК Волкина и Астрахана обеспечивает информацию для определения последовательности аминокислот в фагоспецифичных белках.

Физические свойства этой РНК не были исследованы вплоть до конца лета 1959 г. Тогда Номура, Холл и Спигелман [35] изучили ее взаимоотношения с уже охарактеризованными растворимой и рибосомной РНК. Они сразу же обнаружили, что Т2-РНК совсем не включается в стабильные рибосомы. Вместо этого, при низкой концентрации Mg^{++} ($10^{-4}M$) эта РНК существует в свободном виде, тогда как, по их мнению, в $10^{-2}M$ Mg^{++} она становится частью 30s-рибосомоподобных частиц. В то же самое время Ризеброу в нашей лаборатории начал изучение Т2-РНК, также используя центрифугирование в градиенте сахарозы, и также нашел, что Т2-РНК не является типичной рибосомной РНК. Кроме того, он первый отметил (ранней весной 1960 г.), что в $10^{-2}M$ Mg^{++} большинство Т2-РНК седиментирует не с 30s-частицами, а с большими 70s- и 100s-рибосомами.

Его результаты естественно привели к гипотезе о том, что синтез фагоспецифичного белка происходит на генетически неспецифичных рибосомах, с которыми связываются метаболически нестабильные молекулы матричной РНК. Под влиянием вышеупомянутых метаболических и генетических экспериментов в Пастеровском Институте Бреннер и Жакоб убедились, что пришло время для демонстрации метаболически нестабильных РНК-матриц, которые Жакоб и Моно называли messenger-РНК [36]. В июле 1960 г. они переехали в Пасадену для выполнения решающего эксперимента в лаборатории Мезельсона. Они доказали, что вся Т2-мРНК должна связываться со старыми рибосомами, синтезированными перед заражением. Они это изящно показали [37], заражая в легкой (C^{12} , N^{13}) среде меченные тяжелыми изотопами (C^{13} , N^{15}) бактерии *E. coli*. Последующее центрифугирование в градиенте плотности $CsCl$ выявило, что большинство Т2-мРНК действительно связывается со «старыми» рибосомами, а также, что весь связанный с рибосомами зарождающийся белок оказывается меченым во время кратковременной экспозиции с радиоактивными аминокислотами.

ДЕМОНСТРАЦИЯ МОЛЕКУЛ MESSENGER-RНК В НЕЗАРАЖЕННЫХ БАКТЕРИЯХ

Равным образом мы были убеждены в том, что мРНК можно найти и в незараженных бактериях. Доказательство ее существования представляло тогда сложную задачу из-за одновременного синтеза рибосомной и растворимой РНК. Как раз в то время (май 1960 г.) Франк Гро посетил нашу лабораторию. Вместе с Курландом и Джильтбертом мы решили искать меченые молекулы мРНК в клетках, подвергнутых кратковременной экспозиции ее радиоактивными предшественниками. Опыты с клетками, зараженными фагом Т2, позволяли предположить, что Т2-мРНК составляет 2—4% от суммарной РНК и что большинство ее молекул существует менее нескольких минут. Если сходное положение справедливо для незараженных клеток, тогда в течение любого короткого интервала большая

часть синтезированной РНК была бы messenger-РНК. При этом не было бы никакого значительного ее накопления, поскольку она разрушалась бы почти так же быстро, как и образовывалась.

И снова гипотеза об мРНК подтвердилась [38]. Импульсно меченная РНК в 10^{-2} М Mg^{++} была связана главным образом с 70s- и 100s-рибосомами. При низкой концентрации Mg^{++} (10^{-4} М) она освобождалась от рибосом и седиментировала со средней константой седиментации 14s. В соответствии с предположением о том, что эта РНК образуется на большом числе участков бактериальной хромосомы, анализ соотношения оснований обнаружил молекулы ДНК-подобной РНК. Вскоре после этого Холл и Спигелман создали искусственные гибридные молекулы «Т2-ДНК: Т2-мРНК», а затем гибридные молекулы «*E. coli*-ДНК: *E. coli* — импульсно меченная РНК» были получены в нескольких лабораториях [40]. Таким образом, без сомнения, было доказано происхождение мРНК от ДНК-матриц.

РОЛЬ MESSENGER-RНК В БЕСКЛЕТОЧНОМ СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

После этого можно было предположительно судить, почему дезоксирибонуклеаза частично подавляет включение аминокислот в экстрактах *E. coli*. Гипотеза о мРНК подсказала идею о том, что ДНК в таких экстрактах является матрицей для построения мРНК. Эта вновь синтезированная мРНК затем связывается с рибосомами, где она служит дополнительной матрицей для синтеза белка. Поскольку дезоксирибонуклеаза разрушает только способность продуцировать мРНК, она не влияет на мРНК, уже существующую во время приготовления экстракта. Следовательно, независимо от применяемой концентрации дезоксирибонуклеазы, всегда будет происходить остаточный синтез белка. Эксперименты Тисьера и Гопкинса [41] в нашей лаборатории и Берга, Чемберлена и Вуда [42] в Стенфорде подтвердили эти идеи. Во-первых, было показано, что добавление ДНК к экстрактам, предварительно лишенным ее, значительно повышает интенсивность включения аминокислот. Во-вторых, одновременно с синтезом белка *in vitro* происходит и синтез РНК. Эта РНК имеет ДНК-подобный состав, связана с рибосомами в 10^{-2} М Mg^{++} и физически сходна с мРНК, синтезированной *in vivo*.

Кроме того, Тисьер показал, что добавление фракций, обогащенных мРНК, в 2—5 раз стимулирует синтез белка *in vitro*. Поразительные результаты поступили от Ниренберга и Маттеи [43]. Они привели доказательство того, что разрушение мРНК может быть основной причиной, которая останавливает синтез белка *in vitro*. Если это так, то *преинкубированные экстракты*, дефицитные по природной мРНК, должны в большей степени реагировать на добавление свежей матрицы. Таким путем эти авторы смогли продемонстрировать 20-кратное увеличение синтеза белка после добавления очищенной фенольным методом РНК *E. coli*. Подобно активной фракции Тисьера, их стимулирующая фракция РНК седиментировала гетерогенно. Это доказывает, что обнаруженный эффект не связан с рибосомной или растворимой РНК. Более убедительное подтверждение появилось тогда, когда к преинкубированным экстрактам *E. coli* добавили РНК вируса табачной мозаики. Снова имело место 10—20-кратное стимулирование включения аминокислот. Здесь уже не могло быть никакой путаницы с матричным влиянием рибосомной РНК. Еще более поразительным [44] был эффект добавления полиурпидиловой кислоты (однонитчатой, подобно РНК вируса табачной мозаики). Она специфически направляла включение фенилаланина в полифенилаланин. После этого эксперимента (июнь 1961 г.) концепция мРНК стала фактом. Итак, существовало прямое доказательство того, что однонитчатая мРНК является матрицей для построения белка.

ПРИСУТСТВИЕ μ РНК В АКТИВНЫХ РИБОСОМАХ

В системах *in vitro* обычно только 10—20% рибосом *E. coli* содержит связанную мРНК. Впервые это было показано в опытах Ризеброу [45], который центрифугировал экстракты клеток, зараженных фагом Т2 через градиент сахарозы. Было найдено, что рибосомы, содержащие меченую мРНК, двигаются быстрее обычных. Аналогично этому Джилберт [46] показал, что эти быстрее седиментирующие рибосомы «активны», т. е. способны включать аминокислоты в белки. Свежие бесклеточные экстракты центрифугировали через градиент сахарозы. Фракции, расположившиеся вдоль градиента, были собраны и проверены на способность синтезировать белок. Было найдено полное соответствие между «активностью» рибосом и присутствием в них мРНК. Кроме того, если экстракты центрифугировать *после* включения аминокислот, то зародившиеся цепи белков также оседают вместе с небольшой фракцией быстро седиментирующих рибосом [45]. Эти рибосомы еще содержат мРНК. Если молекулы мРНК разрушить рибонуклеазой (при слабых дозах РНК-азы рибосомы остаются неповрежденными), то зародившийся, связанный с рибосомами белок седиментирует вместе с 70s-рибосомами. Таким образом, зародившийся белок не связан с мРНК, а должен быть прямо закреплен на рибосомах.

СВЯЗЫВАНИЕ тРНК С РИБОСОМАМИ

Эксперименты Швита [47] и Динцеса [48] показали, что рост белков происходит благодаря ступенчатому добавлению индивидуальных аминокислот, начинаясь с NH_2 -терминального конца. Поскольку непосредственными предшественниками являются молекулы аминоацил — тРНК, результаты этих авторов предсказывают, что полипептидная цепь заканчивается растущим карбоксильным концом, связанным с молекулой тРНК (рис. 5). Чтобы проверить эту схему, мы предприняли некоторые исследования с целью увидеть, связывается ли тРНК специфически с рибосомами. Кеннон и Краг [49] первыми исследовали такое связывание в отсутствие протеосинтеза. Они показали, что в 10^{-2} M Mg^{++} каждая 50s-субъединица 70s-рибосомы обратимо связывает одну молекулу тРНК. Примерно одинаковое обратимое связывание наблюдается как в случае аминоацил — тРНК, так и в случае свободной тРНК как при синтезе белка, так и в отсутствие его.

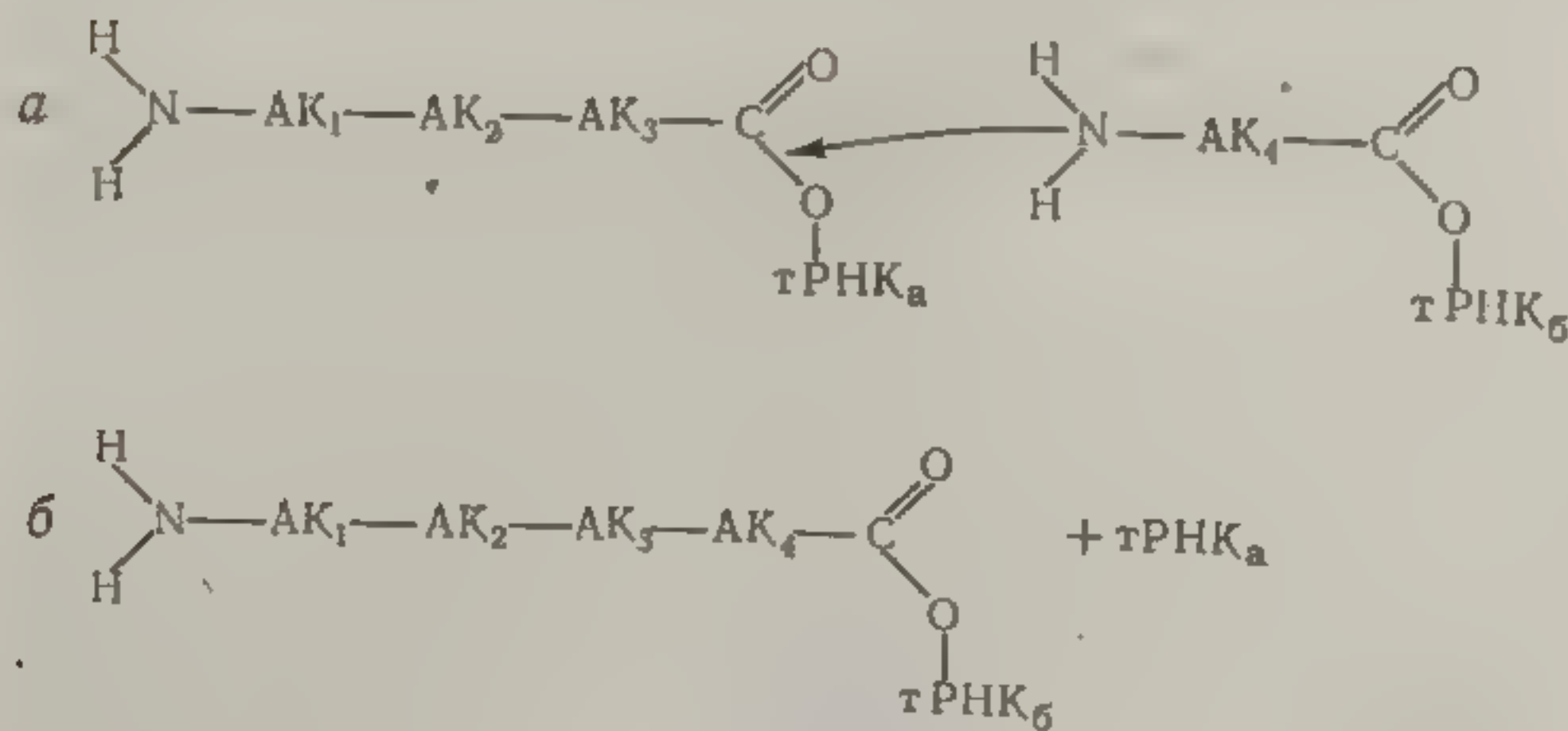


РИС. IX-5.

Поэтапный рост полипептидной цепи.

Синтез начинается со свободного NH_2 -конца, точку роста завершает молекула тРНК

Однако протеосинтез влияет на связывание, наблюдающееся при 10^{-4} М Mg^{++} . При понижении концентрации Mg^{++} от 10^{-2} до 10^{-4} М без синтеза белка совершенно не остается тРНК, связанной с рибосомами. Напротив, после включения аминокислот молекулы тРНК становятся прочно фиксированными на «спитых» 70s-рибосомах, зарождающиеся полипептидные цепи которых предотвращают легкую диссоциацию на 30s- и 50s-субъединицы. По-видимому, одна молекула тРНК связывается с каждой спитой рибосомой. Длительный диализ против 10^{-4} М Mg^{++} фактически разрывает часть таких спитых рибосом. В этом случае всю связанную тРНК, так же как почти весь зародившийся белок, можно обнаружить связанными с 50s-компонентом, что подтверждает гипотезу о том, что эти связанные молекулы тРНК непосредственно соединены с растущими цепями белка (рис. 6). Прямое доказательство этого вытекает из недавних экспериментов Джилберта [50], который использовал детергент дюпонол, чтобы диссоциировать эти 50s-рибосомы на белковый и рибонуклеиновый компоненты. В этом случае зародившийся белок и связанная тРНК остаются вместе при центрифугировании в градиенте сахарозы и при прохождении через колонку с Сефадексом Y-200. Однако после обработки либо слабой щелочью, либо гидроксиламином (известно, что эти воздействия разрушают аминокислотные связи) тРНК и зародившиеся белки движутся раздельно.

Значение такого обратимого связывания тРНК с неактивными (без мРНК) рибосомами неизвестно. Предполагается, что внутри растущих клеток рибосомы связывают мРНК и синтезируют белок. В этих условиях только те молекулы тРНК, которые соответствуют специфической последовательности оснований мРНК, могут пройти внутрь рибосом. Однако когда в большинстве рибосом отсутствуют РНК-матрицы, как в наших бесклеточных экстрактах, любая молекула тРНК, «заряженная» или «незаряженная» аминокислотой, может занять любое место. Все данные свидетельствуют о том, что ковалентные связи не участвуют в удержании зарождающихся цепей на рибосоме. Вместо этого представляется вероятным, что место прочной связи включает терминальный остаток тРНК, прикрепленный зависящими от магния вторичными силами к углублению в 50s-рибосоме. Интенсивный диализ против 5×10^{-5} М Mg^{++} (который оставляет неповрежденными 30s- и 50s-рибосомы) снимает зарождающиеся цепи с 50s-рибосом [50, 51]. Освобожденные полипептиды седиментируют

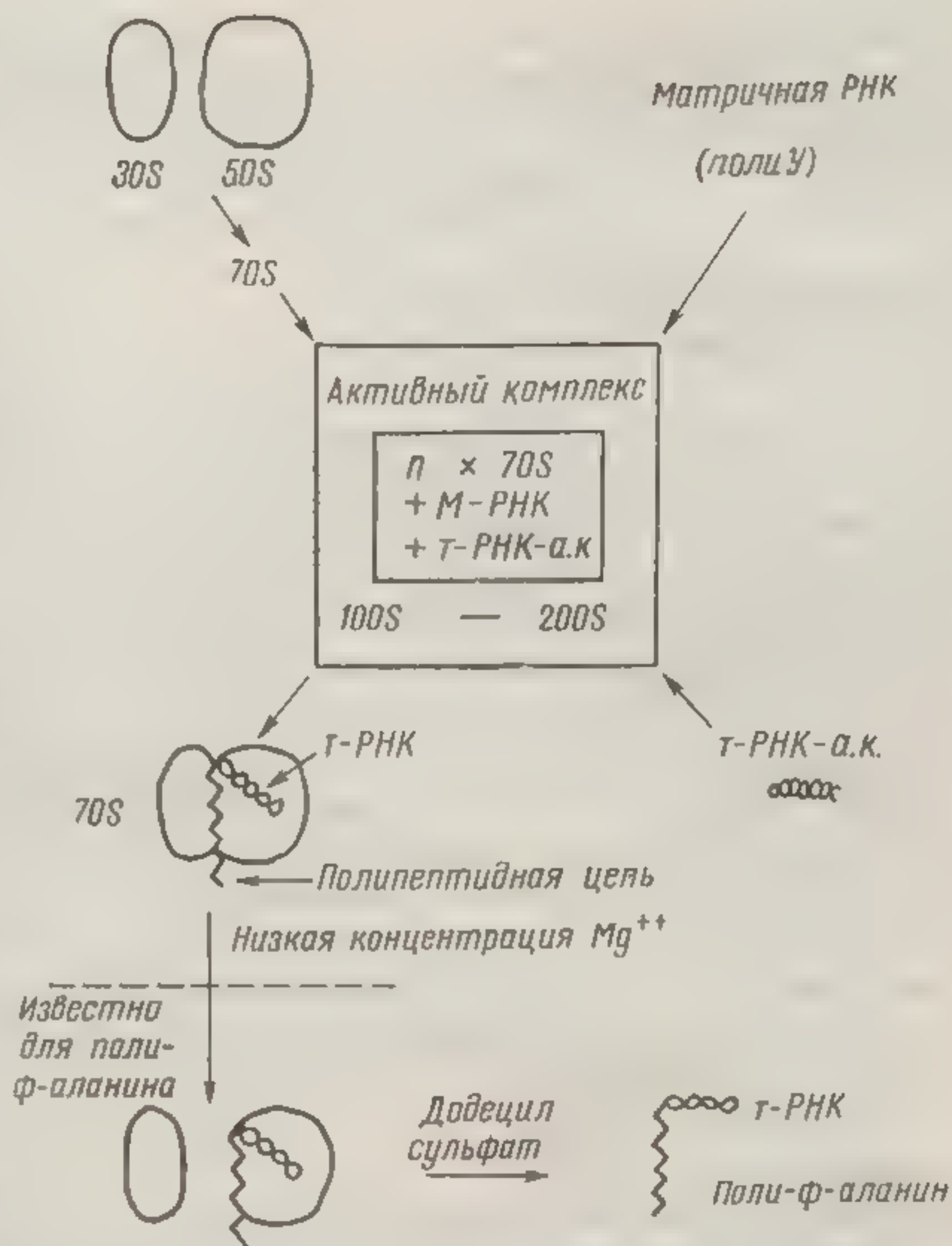


РИС. IX-6.

Схематическое обобщение участия рибосом в синтезе белка (активный комплекс изображен на рис. IX-7)

с константой около 4s, и, если латентная рибонуклеаза еще не активировалась, то они, вероятнее всего, содержат терминально связанную тРНК. Если концентрацию Mg^{++} снова довести до $10^{-2}M$, многие освобожденные цепи снова садятся на рибосомы.

ДВИЖЕНИЕ мРНК-МАТРИЦЫ ПО ПОВЕРХНОСТИ РИБОСОМЫ

Таким образом, в любое заданное время каждая функционирующая рибосома содержит только одну растущую полипептидную цепь. По мере того как происходит ее удлинение, NH_2 -терминальный конец отодвигается от точки образования пептидной связи; за это время, вероятно, пептид может в основном приобрести свою окончательную трехмерную конфигурацию, прежде чем терминальные аминокислоты присоединятся к карбоксильному концу. мРНК должна быть связана таким образом, чтобы только определенные молекулы аминоацил — тРНК входили в то место рибосомы, где может образовываться пептидная связь. Это требует образования специфических водородных связей (между парами оснований?) между матрицей в мРНК и несколькими (наиболее вероятно тремя) нуклеотидами вдоль молекулы тРНК. Тогда в присутствии необходимых ферментов аминоацильная связь с тРНК, которая в данный момент является терминальной, разорвется, и образуется пептидная связь с правильно расположенной очередной аминоацил — тРНК (рис. 5). Все это должно создать энергетически невыгодную ситуацию для уже свободной молекулы тРНК, вызывающую выталкивание ее из места связывания тРНК. Затем новая терминальная тРНК передвигается на это место, завершая цикл синтеза. Неизвестно, остается ли мРНК связанной с вновь вошедшей аминоацил — тРНК. Однако если это так, то мРНК обязательно передвинется на определенное расстояние по поверхности рибосомы так, чтобы поместить свою очередную группу специфических нуклеотидов в положение, обеспечивающее точный выбор очередной аминокислоты. Независимо от того, что представляет собой такой механизм, цепь мРНК обязательно передвигается по рибосоме. Если на рибосоме имеется только одно специфическое место образования пептидной связи, то мРНК и рибосома не могут оставаться в статической ориентации друг относительно друга.

СВЯЗЫВАНИЕ ОДНОЙ МОЛЕКУЛЫ мРНК С НЕСКОЛЬКИМИ РИБОСОМАМИ

Добавление синтетической матрицы поли-У к экстрактам, содержащим в основном 70s-рибосомы, ведет к созданию новых активных рибосом, которые седиментируют в районе 150—200s [52]. Закрепление одной молекулы поли-У (мол. вес = 100 000) на 70s-рибосоме (мол. вес = 3×10^6) не должно значительно увеличивать скорость седиментации рибосомы. Невероятно также, чтобы в этих опытах очень большое число молекул поли-У комбинировалось с индивидуальными рибосомами: молярное отношение поли-У к 70s-рибосомам было меньше 1/5. Единственное правдоподобное объяснение предусматривает образование агрегатов рибосом, связанных с одной молекулой поли-У. Если среднее расстояние между нуклеотидами равно 3,4 Å, то 300 нуклеотидов в молекуле поли-У с молекулярным весом 10s будут иметь длину цепи около 1000 Å. Таким образом, возможно одновременное связывание молекулы поли-У с группой из 4—8 рибосом (диаметр ≈ 200 Å) в зависимости от способа прохождения мРНК по рибосомной поверхности (или через нее). Эта оценка хорошо согласуется со средним размером агрегата, выведенным на основании скорости седиментации «активных» комплексов. Седиментационный анализ экстрактов

после
связан

Так
менно
на каж
ность п
дующи
рую ов
какой-
ческой
заверш
тем ста
возмо
протеос

Зна
воляет
о мРНК
констан
молеку
заниже
шения
дую мо
сом. Оч
ционир
синтеза
предста
активн
рибосом
верно,
разруш
быстро

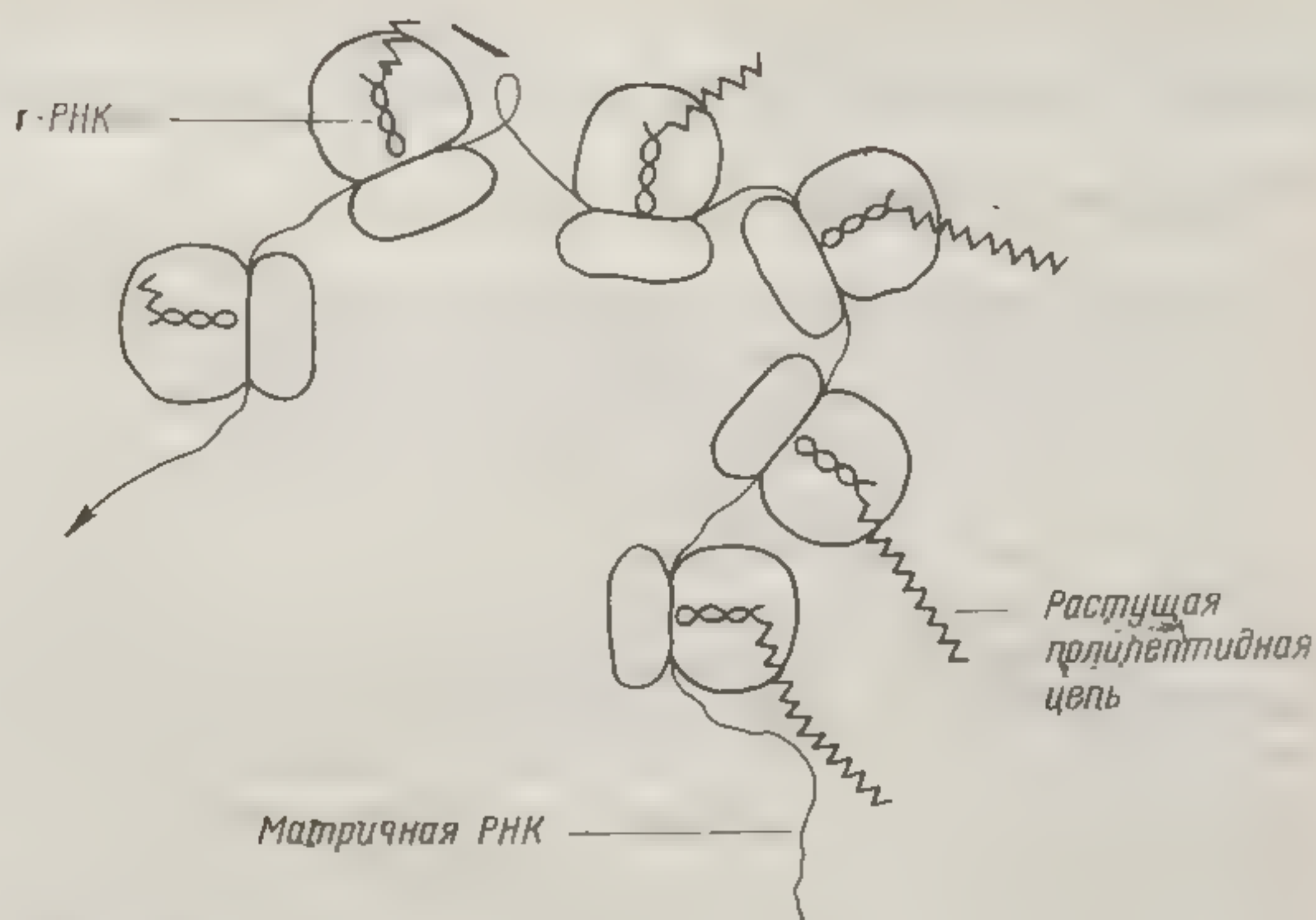


РИС. IX-7.

Связывание матричной РНК с несколькими рибосомами.

Изображение схематично, так как место связывания мРНК с рибосомой неизвестно

после включения показывает, что основная масса полифенилаланина связана с быстро седиментирующими «активными» рибосомами.

Таким образом, наиболее вероятно, что одна молекула мРНК одновременно двигается по поверхностям нескольких рибосом, функционируя на каждой из них как матрица для синтеза белка (рис. 7). Последовательность полипептидных цепей возрастающей длины должна определяться следующими друг за другом рибосомами в зависимости от доли мРНК, которую они прошли. Когда вся мРНК продвинулась через место синтеза, какой-то механизм (который, возможно, включает какой-то специфической последовательностью нуклеотидов в матрице) должен освободить завершённую молекулу белка. Только что освободившаяся рибосома затем становится способной присоединить свободный конец другой (или, возможно, даже той же самой) молекулы мРНК и начинает новый цикл протеосинтеза.

Знание того, что одна молекула мРНК связывает много рибосом, позволяет объяснить постоянный парадокс, который сопровождал гипотезу о мРНК. Около 2—4% РНК *E. coli* является мРНК [40, 53]. Её средняя константа седиментации равна 14s [54], что свидетельствует о её среднем молекулярном весе около 500 000. Это значение, быть может, слишком занижено, так как мРНК очень трудно полностью предохранить от разрушения под действием того или иного фермента. Таким образом, на каждую молекулу мРНК должно приходиться по крайней мере 6—8 70s-рибосом. Очень трудно представить себе, чтобы в каждый данный момент функционировало только 10—20% рибосом, ибо в различных условиях скорость синтеза белка пропорциональна концентрации рибосом [55]. Вместо этого представляется гораздо более вероятным, что *in vivo* почти все рибосомы активны. Однако во время приготовления клеточных экстрактов многие рибосомы могут потерять свою мРНК и стать неактивными. Если это верно, то можно ожидать, что при использовании более мягких методов разрушения в экстрактах *E. coli* будет наблюдаться большое количество быстро седиментирующего активного материала. Уже имеются сообщения

[56] о том, что свыше 50% рибосом из ретикулоцитов млекопитающих существует в виде агрегатов из 5—6 80s-частиц. Кроме того, именно эти агрегаты рибосом синтезируют белок как *in vivo*, так и *in vitro*.

ВРЕМЯ ЖИЗНИ МАТРИЦЫ

Согласно вышеуказанной схеме молекула мРНК может функционировать неограниченно долгое время. Нестабильные же бактериальные матрицы выполняют свою функцию в среднем только 10—20 раз. Этот факт вытекает из опытов, выполненных в лаборатории Левинталя [57], где синтез новой мРНК блокировали добавлением антибиотика актиномицина Д. Предсуществующая мРНК из *Bacillus subtilis*, растущей с периодом генерации 60 минут, затем разрушалась с длительностью периода полураспада, равной 2 минутам; синтез белка прекращался с соответствующей скоростью. Таким образом, должен существовать механизм, специфически разрушающий молекулы мРНК. В бактериальных экстрактах активны ферменты (полинуклеотидфосфорилаза и зависящая от K^+ диэстераза), которые быстро разрушают свободную мРНК [58]. Однако их действие гораздо менее эффективно в том случае, когда мРНК связана с рибосомами [59]. Можно предположить, что у свободного головного конца цепи мРНК существует случайная альтернатива: связываться с вакантной рибосомой или ферментативно разрушиться. В таком случае столь важный выбор определялся бы случайным событием, не имеющим отношения к биологической потребности определенных мРНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теперь у нас может быть значительная уверенность в том, что общие черты протеосинтеза нами поняты. Участие РНК в этом процессе оказалось гораздо более сложным, чем представлялось в 1953 г. Имеется даже не одна функционирующая РНК; для синтеза белка требуется упорядоченное взаимодействие трех классов РНК: рибосомной, транспортной и матричной. Однако многие важные аспекты этой проблемы пока остаются без ответа. Например, нет никакой теоретической основы для изучения субъединиц рибосом; мы ничего не знаем и о функциональном значении рибосомной РНК. Наиболее удовлетворительным является осознание того, что все этапы репликации белка протекают с участием хорошо изученных химических сил. Мы еще не знаем всех деталей процесса. Участвует ли комплементарное взаимодействие между парами оснований, наблюдаемое в ДНК, в отборе молекулой мРНК соответствующих аминокислот — тРНК? Очевидно, ответ на подобные вопросы скоро будет известен. Нам остается надеяться, что грядущий прогресс в понимании избирательного синтеза белка (и его значения для эмбриологии) приведет к открытию столь же простой, вполне определенной и легкой для понимания химической основы этого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Pauling a. R. B. Corey. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1951, 37, 235.
2. J. D. Watson a. F.H.C. Crick. Nature, 1953, 171, 737.
3. J. D. Watson a. F.H.C. Crick. Nature, 1953, 171, 964.
4. P. Jordan. Physik Z., 1938, 39, 711.
5. Взгляды Полинга частично изложены в его совместной с Дельбрюком заметке: Science, 1940, 92, 77.
6. J. Brachet. Arch. Biol. Liege, 1942, 53, 207; T. Caspersson. Naturwiss., 1941, 29, 33.
7. H. Borsook, C. L. Deasy, A. T. Haagen-Smit, G. Keighley and P. H. Lowy. J. Biol. Chem., 1950, 187, 839; T. Hultin. Exp. Cell Res., 1950, I, 376.

8. J. 21
9. A. 19
10. F. 40
11. D. «T
12. M. J.
13. H. 38
14. E. the
15. A. D. H. Bi
16. H. rac
17. B. chi M.
18. C.
19. J. A
20. P.
21. D.
22. P.
23. J. 111 P. a.
24. M. 195
25. M. J.
26. F. A
27. P. A
28. A. 145
29. F. C
30. C. I
31. M. A
32. S. A
33. A. I
34. E. A
35. M. A
36. F. J
37. S. A
38. F. G Nat
39. B. I
40. M. W. bor
41. A. T
42. M. a. A
43. M. I
44. M. I

8. J. M. Littlefield, E. B. Keller, J. Gross and P. C. Zamechnik. J. Biol. Chem., 1955, 217, 111; V. G. Alfrey, M. M. Daly and A. E. Mirsky. J. Gen. Physiol., 1953, 37, 157.
9. A. Rich and J. D. Watson. Nature, 1954, 173, 995; Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1954, 40, 759.
10. F. H. C. Crick and J. D. Watson. Nature, 1956, 177, 473; Ciba Foundation Symposium «The nature of Viruses», 1957.
11. D. L. D. Caspar. Nature, 1956, 177, 475.
12. M. L. Peterman and M. G. Hamilton. J. Biol. Chem., 1957, 224, 725; P. O. Tso, J. Bonner and J. Vinograd. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, 725.
13. H. K. Shachman, A. B. Pardee and R. Y. Stanier. Arch. Biochem. Biophys., 1952, 38, 245.
14. E. T. Bolton, B. H. Hoyer and D. B. Ritter. Microsomal Particles and Protein Synthesis. Pergamon Press, N. Y., 1958, p. 18.
15. A. Tissières and J. D. Watson. Nature, 1958, 182, 778; J. D. Watson, A. Tissières, D. Schlessinger and B. R. Hollingworth. J. Mol. Biol., 1959, 1, 221; C. E. Hall and H. S. Slayter. J. Mol. Biol., 1959, 1, 329; H. E. Huxley and G. Zubay. J. Mol. Biol., 1960, 2, 10.
16. H. Lamfrom and E. R. Glowacki. J. Mol. Biol., 1962, 5, 97; P. O. Tso and J. Vinograd. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 113.
17. B. Hall and P. Doty. J. Mol. Biol., 1959, 1, 111; U. Z. Littauer and H. Eizenberger. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 32, 320; S. M. Timasheff, A. Brown, J. S. Colter and M. Davies. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 662.
18. C. G. Kurland. J. Mol. Biol., 1960, 2, 83.
19. J. P. Waller and J. I. Harris. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1961, 47, 18.
20. P. E. Spahr. J. Mol. Biol., 1962, 4, 395.
21. D. Elson. Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 216; 1959, 36, 372.
22. P. F. Spahr and B. R. Hollingworth. J. Biol. Chem., 1961, 236, 823.
23. J. W. Littlefield, E. B. Keller, J. Gross, P. C. Zamechnik. J. Biol. Chem., 1955, 217, 111; J. W. Littlefield and E. B. Keller. J. Biol. Chem., 1957, 224, 13; P. C. Zamechnik and E. B. Keller. J. Biol. Chem., 1954, 209, 337; E. B. Keller and P. C. Zamechnik. J. Biol. Chem., 1956, 221, 45.
24. M. B. Hoagland, P. C. Zamechnik and M. L. Stephenson. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 215.
25. M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht and P. C. Zamechnik. J. Biol. Chem., 1958, 231, 241.
26. F. H. C. Crick. Symp. Soc. Exptl. Biol; 1958, 12, 138.
27. P. Berg and E. J. O'fegand. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1958, 44, 78.
28. A. Tissières, D. Schlessinger and F. Gross. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1960, 46, 1450.
29. F. Gros and D. Schlessinger. Неопубликованные эксперименты.
30. C. I. Davern and M. Meselson. J. Mol. Biol., 1960, 2, 153.
31. M. Riley, A. Pardee, F. Jacob and J. Monod. J. Mol. Biol., 1960, 2, 216.
32. S. Naono and F. Gros. Compt. Rend., 1960, 250, 3889.
33. A. D. Hershey, J. Dixon and M. Chase. J. Gen. Physiol., 1953, 36, 777.
34. E. Volkin and L. Astrachan. Virology, 1956, 2, 149.
35. M. Nomura, B. D. Hall and S. Spiegelman. J. Mol. Biol., 1960, 2, 306.
36. F. Jacob and J. Monod. J. Mol. Biol., 1961, 3, 318.
37. S. Brenner, F. Jacob and M. Meselson. Nature, 1961, 190, 576.
38. F. Gros, H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risebrough and J. D. Watson. Nature, 1961, 190, 581.
39. B. D. Hall and S. Spiegelman. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1961, 47, 137.
40. M. Hayashi and S. Spiegelman. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1961, 47, 1564; F. Gros, W. Gilbert, H. Hiatt, G. Attardi, P. E. Spahr and J. D. Watson. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26.
41. A. Tissières and J. W. Hopkins. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1961, 47, 2015.
42. M. Chamberlin and P. Berg. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1962, 48, 81; W. B. Wood and P. Berg. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1962, 48, 94.
43. M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1961, 4, 404.
44. M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1961, 47, 1588.

45. R. W. Risebrough, A. Tissières a. J. D. Watson. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1962, 48, 430.
46. W. Gilbert. J. Mol. Biol., 1963, 6, 374.
47. J. Bishop, J. Leahy a. R. Schweet. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1960, 46, 1030.
48. H. Dintzes. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1961, 47, 247.
49. M. Cannon, R. Krug and W. Gilbert. J. Mol. Biol., 1963, 7, 360.
50. W. Gilbert. J. Mol. Biol., 1963, 5, 389.
51. D. Schlessinger a. F. Gros. J. Mol. Biol., 1963, 6, 350.
52. S. H. Barondes a. M. W. Nirenberg. Science, 1962, 138, 813; G. J. Spyrides a. F. Lipmann. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1962, 48, 1977; W. Gilbert. J. Mol. Biol. 1963, 6, 374.
53. S. S. Cohen, H. D. Barner, a. J. Lichtenstein. J. Biol. Chem., 1961, 236, 1448.
54. R. Monier, S. Naono, D. Hayes a. F. Gros. J. Mol. Biol., 1962, 5, 311; K. Asano, Неопубликованные эксперименты, 1962.
55. O. Maalae. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 45; F. C. Neihardt a. D. Fraenkel. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 63.
56. A. Gierer. J. Mol. Biol., 1963, 6, 148; J. R. Warner, P. M. Knopf a. A. Rich. Proc. Nat. Acad. Sci., 1963, 49, 122.
57. C. Levinthal, A. Keynan a. A. Higa. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1962, 48, 1631.
58. H. Sekiguchi a. S. S. Cohen. J. Biol. Chem., 1963, 238, 349; D. Schlessinger a. P. F. Spahr. J. Biol. Chem., 1963, 238, 6.
59. R. Gesteland a. J. D. Watson. В печати.

Приложение X

К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОДЕ

Ф. КРИК

Нобелевская лекция, 1962 г.

Входящая в это Нобелевское чтение часть работы, которая касается структуры и репликации ДНК, была рассмотрена Вилкинсом в этом году в его Нобелевской лекции. Идея репликации ДНК, выдвинутая Уотсоном и мной, также была упомянута Корнбергом в его Нобелевской лекции в 1959 г., в которой шла речь о его блестящих исследованиях по энзиматическому синтезу ДНК *in vitro*. В этой лекции я рассмотрю современное состояние проблемы о переносе информации в живой материи — проблемы генетического кода, — которая давно интересовала меня и в области которой мои коллеги и я, среди многих других, недавно выполнили некоторые экспериментальные исследования.

Сейчас, по-видимому, окончательно установлено, что последовательность аминокислот белка определяется последовательностью оснований некоторого участка отдельной молекулы нуклеиновой кислоты. Как правило, белки содержат 20 различных аминокислот, а в нуклеиновой кислоте встречается лишь четыре главных вида азотистых оснований. Генетический код характеризует тот путь, которым последовательность 20 или большего числа аминокислот определяется последовательностью четырех оснований различного типа.

Вряд ли необходимо особо подчеркивать биологическое значение этой проблемы. Очевидно, носителем большей части (если не всей) генетической информации в любом организме является нуклеиновая кислота — обычно ДНК, хотя некоторые мелкие вирусы в качестве генетического материала используют РНК. Вероятно, большая часть этой информации используется для определения аминокислотной последовательности белков данного организма. Мы еще не знаем, несет ли генетическая информация какую-нибудь другую важную функцию. Эта идея выражена классическим афоризмом Бидла: «один ген — один фермент», — или по сегодняшней более искусственной, но несколько тяжеловесной терминологии: «один цистрон — одна полипептидная цепь».

Одним из наиболее поразительных обобщений биохимии, которое, к удивлению, едва ли даже упоминается в учебниках, является то, что 20 аминокислот и 4 азотистых основания, за малыми исключениями, одни и те же для всего живого. Насколько я знаю, принятая теперь система из 20 аминокислот была впервые составлена Уотсоном и мной летом 1953 г. в ответ на письмо Гамова.

В этой лекции я не буду останавливаться на интимных технических деталях проблемы хотя бы потому, что я недавно написал на эту тему обзор [1], который скоро будет опубликован. Я не буду рассматривать биохимические детали синтеза белка и РНК, так как о них уже рассказал Уотсон. Я собираюсь скорее поставить некоторые общие вопросы, касающиеся генетического кода, и выяснить, насколько подробно мы можем сейчас на них ответить.

Допустим, что генетический код является простым кодом, и зададим вопрос: сколько оснований кодируют одну аминокислоту? Вряд ли это будет пара оснований, так как из четырех различных событий мы можем образовать только $4 \times 4 = 16$ различных пар, тогда как нам нужно по крайней мере 20 и, вероятно, еще одну или две для обозначения интервалов

или для других целей. Триплеты же оснований дали бы нам 64 возможности. Этого достаточно, чтобы иметь «язык» для кодирования каждой аминокислоты набором оснований, который я буду называть «кодоном».

Это рассуждение подводит нас к ответу на первый вопрос. Являются ли кодоны перекрывающимися? Другими словами, находим ли мы при считывании генетической матрицы основание, которое является одновременно членом двух или более кодонов? То, что кодоны *не перекрываются*, теперь представляется достаточно убедительным. Если бы они перекрывались, то тогда изменение одного основания вследствие мутации вызвало бы замену двух или более соседних аминокислот. Однако как в случае «спонтанных» мутаций, примером которых может служить ненормальный гемоглобин человека, так и в случае химически индуцированных мутаций, например мутаций вируса табачной мозаики, вызванных действием азотистой кислоты или других веществ, всегда происходит замена одной аминокислоты [2]. Поэтому по всей вероятности кодоны не перекрываются.

Это приводит нас к следующей проблеме. Каким образом последовательности оснований распределяются по кодонам? В скелете нуклеиновой кислоты, который строго регулярен, нет ничего, что бы показало нам, как группировать основания в кодоны. Например, если все кодоны — это триплеты, то тогда кроме правильного считывания матрицы могли бы иметь место и два неправильных. Неправильные считывания произошли бы в тех случаях, когда мы начинали бы их не с первого нуклеотида кодона, а со второго или с третьего. Мои коллеги и я [3] недавно получили экспериментальные данные, согласно которым каждый участок генетической матрицы действительно начинает считываться с фиксированной точки, вероятно, с одного из концов. Это очень хорошо согласуется с экспериментальными данными о том, что сборка аминокислот в полипептидную цепь начинается с NH_2 -конца и происходит в линейном порядке. Наиболее четко это показано в работе Динциса [4].

Это приводит нас к следующему важному вопросу: о размере кодона. Из скольких оснований состоит каждый кодон? Эксперименты, на которые я только что ссылался [3], свидетельствуют о том, что все (или почти все) кодоны состоят из триплета оснований, хотя наши данные полностью и не исключают того, что число оснований в триплете больше трех, но кратно трем (6 или 9). К такому выводу мы пришли, изучая мутации в А и В цистронах rII -локуса бактериофага Т4. Предполагается, что эти мутации являются результатом добавления или исключения одного или более оснований из генетической матрицы. Эти мутации специфичны для действия акридинов и не могут быть ревертированы такими мутагенами, которые вызывают только замену одного основания другим. Кроме того, такие мутации почти всегда делают ген неактивным полностью, а не частично.

Тестируя такие мутации парами, мы можем их все без исключения разделить на два класса, которые обозначим $+$ и $-$. Упрощенно можно представить дело так, что $+$ класс имеет одно дополнительное основание в той или иной точке генетической матрицы, а $-$ класс характеризуется отсутствием одного основания. В решающем эксперименте с помощью генетической рекомбинации нужно объединить три мутации одного типа в одном гене — т. е. либо $(+c+c+)$, либо $(-c-c-)$. Оказывается, что в то время как один $+$ или два $+$ $(+c+c+)$ делают ген полностью неактивным, соответствующим образом подобранный набор из трех $+$ обладает некоторой активностью. Детальный анализ этих результатов показывает, что они полностью соответствуют тем, какие мы должны были бы ожидать, если бы матрица считывалась триплетами, начиная с одного конца.

Иногда нас спрашивают, каков был бы результат, если бы мы соединили в одном гене четыре $+$. Чтобы ответить на этот вопрос, мои коллеги недавно объединили не только четыре, но и шесть $+$. Как и ожидалось по нашей теории, комбинация из шести $+$ активна, тогда как набор из четырех или

пяти + неактивен. Кроме того, нам много пришлось поработать, чтобы объяснить такие комбинации мутаций «minutes», при которых ген функционирует с очень низкой эффективностью. Все полученные нами результаты соответствуют гипотезе о том, что в некоторых случаях, когда механизм, синтезирующий белок, доходит до триплета, не соответствующего нужной аминокислоте (названного «бессмысленным»), то изредка он ошибается и считывает, скажем, только два азотистых основания вместо обычных трех. Эти результаты позволяют также вывести направление считывания мРНК, которое в данном случае происходит слева направо, как это условно принимается для *rII*-локуса. Мы планируем вскоре подробно описать методическую сторону всей этой работы. Окончательное доказательство правильности наших идей может быть получено только при детальном изучении изменений последовательности аминокислот в молекуле белка, вызванных мутациями вышеописанного типа.

Напрашивается еще один вывод общего характера, вытекающий из наших результатов. Число бессмысленных триплетов довольно низко, поскольку лишь изредка можно их обнаружить. Однако этот вывод менее надежен, чем другие наши заключения, касающиеся общей природы генетического кода.

До сих пор еще не было прямо показано, что генетическая матрица «колинеарна» своему продукту (белку), т. е. что один конец гена кодирует N-конец, а другой — С-конец полипептидной цепи, а линейный порядок промежуточных кодонов соответствует линейному порядку аминокислот в белке. Однако существование такой «колинеарности» представляется весьма вероятным, особенно после того, как было показано, что у нескольких организмов мутации, затрагивающие одну и ту же аминокислоту, на генетической карте расположены чрезвычайно близко. Можно с уверенностью ожидать, что экспериментальное доказательство колинеарности гена и определяемой им полипептидной цепи будет получено в течение ближайших нескольких лет.

Имеется еще один общий вопрос, касающийся генетического кода, который мы можем сейчас задать. Универсален ли код, т. е. одинаков ли он у всех организмов? Предварительные данные позволяют предположить, что это вполне возможно. Например, можно синтезировать что-то очень похожее на гемоглобин кролика при использовании бесклеточной системы, часть компонентов которой получена из ретикулоцитов кролика, а часть — из *E. coli* [5]. Если бы код в двух указанных организмах сильно различался, то вряд ли это было бы возможно. Однако, как мы сейчас увидим, универсальность кода можно проверить и более прямыми опытами.

Маловероятно, чтобы в клетке, где ДНК служит генетическим материалом, сама ДНК прямо контролировала синтез белка. Как показал Уотсон, считается, что последовательность оснований ДНК (вероятно, только одной из ее нитей) копируется последовательностью оснований РНК и затем эта особая РНК действует в качестве генетической матрицы, управляя процессом соединения аминокислот в полипептидные цепи. Ниренберг и Маттеи сделали открытие, чрезвычайно важное для проблемы кодирования. Они нашли, что для этой цели можно использовать синтетическую РНК. В частности, они показали, что полиуридиловая кислота (РНК, в которой каждое основание — это урацил), будучи добавленной к бесклеточной системе, синтезирующей полипептидные цепи, приводит к синтезу полифенилаланина. Таким образом, одним из кодонов фенилаланина, по-видимому, является УУУ (где У обозначает урацил; точно так же буквы А, Г и Ц мы будем использовать соответственно для обозначения аденина, гуанина и цитозина). Это открытие позволяло начать быстрое (хотя отчасти и беспорядочное) наступление на генетический код.

Было бы неуместно детально обсуждать эту работу здесь. Я хотел критически обсудить более ранние работы в уже упомянутом обзоре [1], но

темпы работы в этой области таковы, что предпринятые позднее эксперименты уже сделали ее до некоторой степени устаревшей. Однако можно уверенно сделать некоторые общие выводы.

Главный метод, который используют до сих пор как Ниренберг и соавторы [6], так и Очоа и его группа [7], — это ферментативный синтез полимеров с беспорядочным расположением двух или трех оснований. Например, полинуклеотид, который я буду называть поли(У, Ц), содержащий примерно равные количества урацила и цитозина с предположительно случайным их чередованием, будет повышать интенсивность включения фенилаланина, серина, лейцина, пролина и, возможно, треонина. Используя полимеры различного состава и допустив, что код триплетен, можно получить некоторую информацию о составе некоторых триплетов.

Из работ такого рода следует, что с небольшими оговорками каждый полинуклеотид определяет включение характерного набора аминокислот. Кроме того, четыре основания совершенно различны по своему действию. Сравнение триплетов, предварительно установленных этим методом, с изменениями последовательности аминокислот, вызванными мутациями, обнаруживает вполне удовлетворительное соответствие. Более того, это включение требует тех же самых компонентов системы, что и синтез белка, и подавляется теми же ингибиторами. Таким образом, очень трудно допустить, что эта система целиком является артефактом, и вполне вероятно, что она имеет непосредственное отношение к истинному синтезу белка.

Вначале представлялось, что, возможно, каждый из истинных, до сих пор предложенных триплетов должен включать урацил, хотя это и было маловероятно по теоретическим соображениям и не подтверждалось фактическими экспериментальными данными. Первое прямое доказательство того, что это не так, получили мои коллеги Бречер и Грюнберг-Маного [8], которые показали, что поли(Ц, А) может стимулировать включение нескольких аминокислот. Подобного рода данные относительно других полинуклеотидов, не содержащих урацила, недавно получили и другие исследователи [9, 10]. Сейчас представляется весьма вероятным, что многие из 64 триплетов (возможно, большинство из них) могут кодировать ту или иную аминокислоту и что в общем случае несколько различных триплетов могут кодировать одну и ту же аминокислоту. В частности, очень изящный эксперимент [11] позволил предположить, что и (УУЦ), и (УУГ) кодируют лейцин (скобки означают, что еще не известен порядок оснований внутри триплетов). Эта общая идея подтверждается рядом косвенных данных, которые не могут быть здесь детализированы. К сожалению, вышеуказанное значительно затрудняет однозначное определение триплетов таким методом по сравнению с тем случаем, когда для каждой аминокислоты был бы один триплет. Кроме того, при использовании полинуклеотидов со случайной последовательностью нельзя определить *порядок* оснований в триплете. Начали создавать полинуклеотиды с известной последовательностью оснований у одного конца, но полученные результаты пока что являются скорее предположительными, чем окончательными [12]. Однако на основании этих и других неопубликованных результатов представляется вероятным, что N-конец полипептидной цепи соответствует правому концу полинуклеотидной цепи, т. е. концу, заканчивающемуся 2', 3'-гидроксилами пентозы.

По-видимому, можно считать, что единичная цепь РНК способна функционировать как мРНК, поскольку полиУ — это единичная цепь без вторичной структуры. Если же к полиУ добавить полиА, чтобы образовалась двойная или тройная спираль, то такая комбинация оказывается неактивной. Кроме того, имеются предварительные данные [9], которые позволяют предположить, что существование вторичной структуры внутри полинуклеотида подавляет его способность стимулировать синтез белка.

В дополнение к вышеупомянутым генетическим косвенным данным необходимо показать прямыми биохимическими методами, что код действительно триплетен.

Были предприняты попытки установить взаимное расположение оснований в различных триплетах, изучая изменения, вызванные мутациями. Однако я считаю, что, пока мы не располагаем более подробными и надежными данными о составе триплетов, эти попытки преждевременны.

Несколько групп исследователей [8, 9, 11] представили данные, свидетельствующие о том, что полиУ стимулирует включение как фенилаланина, так и, в меньших количествах, лейцина. Значение этого наблюдения не ясно, но оно ставит вопрос о печальной возможности существования неоднозначных триплетов, т. е. триплетов, которые могут кодировать более одной аминокислоты. Однако можно надеяться, что таких триплетов меньшинство.

Представляется вероятным, что большинство из 64 возможных триплетов можно распределить по 20 группам. Сопоставление данных, полученных как в бесклеточных системах, так и при изучении мутаций, позволяет предположить, что это распределение не происходит беспорядочно; вполне возможно, что триплеты, кодирующие одну и ту же аминокислоту, довольно похожи. Это поднимает основную, пока еще не разрешенную, теоретическую проблему. Можно ли вывести эти группировки кодонов, исходя только из теоретических предпосылок? Нетрудно заметить, что кодоны могли возникнуть на самых ранних стадиях эволюции благодаря беспорядочным мутациям, так что код, существующий теперь, по-видимому, может быть результатом серии исторических случайностей. Этот вопрос представляет более чем просто теоретический интерес. Если код в самом деле имеет определенную логическую основу, то с целью ее выяснения было бы правильно рассмотреть любые данные — и хорошие, и плохие. Если же между кодонами нет никакой логической связи, то делать это было бы неправильно. Расшифровка кодона в этом случае становится почти бессмысленной. Важным делом является получение достаточного количества данных для установления природы каждого кодона. Еще не ясно, какие доказательства могут быть с уверенностью приняты для установления природы кодона. Совершенно очевидно, что большинство экспериментальных данных, представленных до сих пор, почти во всех случаях нуждается в проверке. Однако, несмотря на неопределенность большинства экспериментальных данных, некоторые предполагавшиеся ранее коды мы можем теперь отбросить с известной степенью уверенности.

Триплетные коды без запятых

Все такие коды маловероятны, о чем свидетельствуют не только генетические данные, но также и детальные результаты, полученные на бесклеточных системах.

Двух- или трехбуквенные коды

Примером здесь может служить код, в котором А эквивалентно Т, а Г эквивалентно Ц. Как уже говорилось, результаты, полученные на бесклеточной системе, исключают существование таких кодов.

Комбинационный триплетный код

В этом коде все перестановки данной комбинации оснований кодируют одну и ту же аминокислоту. Полученные экспериментальные результаты резко снизили вероятность существования такого кода.

Комплементарные коды

Есть несколько видов таких кодов. Рассмотрим некоторый триплет в связи с триплетом, который комплементарен ему на другой цепи двойной спирали. Можно считать, что второй триплет либо считывается в том же самом направлении, что и первый, либо — в противоположном. Таким образом, если первый триплет УЦЦ, то мы рассматриваем его в связи или с АГГ, или в случае противоположного направления считывания с ГГА.

Можно предположить, что если какой-то триплет кодирует некоторую аминокислоту, то его комплемент обязательно кодирует ту же аминокислоту. В противоположность этому в кодах другого вида комплемент может не символизировать какую бы то ни было аминокислоту, т. е. является бессмысленным.

Группа Очоа [10] недавно показала, что полиА стимулирует включение лизина. Таким образом, ААА, вероятно, кодирует лизин. Однако, поскольку УУУ кодирует фенилаланин, это исключает выше рассмотренные коды. Найдено также, что поли(У, Г) и поли(А, Ц) стимулируют включение разных аминокислот. Подобным образом поли(У, Ц) отличается от поли(А, Г) [9, 10]. Таким образом, мало надежды на то, что все эти теории будут строго доказаны. Кроме того, по моему мнению, все они маловероятны и по общетеоретическим соображениям.

Уже положено начало исследованию универсальности кода с использованием одинаковых полинуклеотидов в бесклеточных системах из различных видов организмов. В конце концов, должно быть относительно просто этим путем установить, универсален ли код, а если нет, то узнать, как он меняется от организма к организму. Из полученных предварительных результатов пока что не следует явных различий между *E. coli* и млекопитающими [10, 13].

Итак, в настоящее время есть основания считать, что генетический код, по-видимому, имеет следующие общие свойства:

- 1) большинство, если не все, кодов состоит из трех (соседних) оснований;
- 2) соседние кодоны не перекрываются;
- 3) мРНК считывается правильными группами из трех оснований, начиная с некоторой фиксированной точки;
- 4) кодовая последовательность гена коллинеарна с последовательностью аминокислот, причем полипептидная цепь синтезируется последовательно, начиная с N-конца;
- 5) в общем случае каждую аминокислоту кодирует более чем один триплет;
- 6) не исключено, что некоторые триплеты могут кодировать более одной аминокислоты, т. е. они могут быть неоднозначными;
- 7) вероятно, триплеты, кодирующие одну аминокислоту, довольно похожи друг на друга;
- 8) неизвестно, имеется ли какое-нибудь общее правило, по которому такие кодоны группируются вместе, или эта группировка представляет собой результат главным образом исторической случайности;
- 9) число триплетов, не кодирующих аминокислоты, вероятно, мало;
- 10) маловероятно, чтобы были правильными также ранее предложенные коды, как код без запятых, двух- или трехбуквенные коды, комбинационный код и различные обратные коды;
- 11) вероятно, код одинаков у различных организмов; он может быть совершенно тождествен у всех организмов, но это еще точно не установлено.

Наконец, следует добавить, что, несмотря на большую сложность синтеза белка и значительные технические трудности, возникающие при

синтезе
можно
и генети
на про

Д И Т

1. F. H.
E. C.
2. H. G.
3. F. H.
4. M. A.
5. G. 10
6. J. H.
M. V.
M. W.
Natl.
7. P. Le
Sci.
J. F.
Acad.
8. M. S.
9. O. W.
10. R. S.
11. B. W.
12. A. J.
13. H. R.
Sci. U.
Sci. U.

¹ Пре
Более

синтезе полинуклеотидов с заданной последовательностью оснований, можно надеяться, что все эти вопросы прояснятся в ближайшем будущем и генетический код в течение нескольких лет будет полностью расшифрован на прочной экспериментальной основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. H. C. Crick in: Progress in Nucleic Acid Research, J. N. Davidson and Waldo E. Cohn (Eds.), Academic Press Inc., N. Y. (in the press).
2. H. G. Wittmann.— Z. Vergleichende Biochemie, 1962, 93, 491.
3. F. H. C. Crick. a. oth.— Nature, 1961, 192, 1227.
4. M. A. Naughton and Howard M. Dintzis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1822.
5. C. von Ehrenstein and F. Lipmann. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 941.
6. J. H. Matthaei and M. W. Nirenberg. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 1580.
M. W. Nirenberg and J. H. Matthaei. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1961, 47, 1588.
M. W. Nirenberg. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 104. J. H. Matthaei.— Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 666.
7. P. Lengyel. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 47 (1961) 1936. J. F. Speyer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 63. P. Lengyel. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 282.
J. F. Speyer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 441. C. Basilio. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 613.
8. M. S. Bretscher and M. Grunberg-Manago.— Nature, 1962, 195, 283.
9. O. W. Jones and M. W. Nirenberg. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 211.
10. R. S. Gardner. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 2087.
11. B. Weisblum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1449.
12. A. J. Wahba. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1683.
13. H. R. V. Arnstein.— Nature, 1962, 194, 1042. E. S. Maxwell. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1639. I. B. Weinstein and A. N. Schechter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 1962, 48, 1686.

¹ Предлагаемый список литературы содержит лишь самые необходимые работы. Более подробный список литературы см. [1].

Приложение XI

ГЕНЕТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Ф. ЖАКОБ

Нобелевская лекция 1965 г.

Если я нахожусь сегодня здесь и разделяю столь высокую честь с А. Львовым и Ж. Моно, то это несомненно происходит только благодаря тому, что когда в 1950 г. я начал свои исследования, я попал именно в нужное место и в нужное время. В нужное место — потому, что там, в верхних этажах Пастеровского института, в атмосфере энтузиазма, здорового критицизма и дружелюбия, возникла новая отрасль науки. В нужное время — потому, что биология переживала тогда период бурной активности, меняя свои подходы, раскрывая в микроорганизмах новый и простой материал и все более приближаясь к физике и химии. Это был тот редкий момент, когда незнание могло стать достоинством.

ЛИЗОГЕНИЯ И КОНЪЮГАЦИЯ БАКТЕРИИ

Лабораторию А. Львова пересекал длинный коридор, где происходили бесконечные дискуссии, обсуждались эксперименты и гипотезы. На одном конце коридора группа Жакоба и Моно добавляла к бактериальным культурам β -галактозиды, чтобы вызвать биосинтез β -галактозидазы, на другом конце коридора А. Львов и его сотрудники подвергали бактерии воздействию ультрафиолетовых лучей, только что обнаружив этот новый метод индуцирования биосинтеза бактериофага. Каждый, следовательно, по-своему что-то «индуцировал», и все были убеждены, что между двумя этими явлениями нет ничего общего, кроме слова «индукция».

Когда я приехал, чтобы работать с А. Львовым над докторской диссертацией, мне поручили изучение лизогении у *Pseudomonas pyocyanea*, и я добросовестно начал облучать этот организм. Вскоре, однако, стало ясно, что проблема лизогении — это прежде всего проблема взаимоотношений между бактерией и бактериофагом, другими словами, проблема лизогении — это одна из проблем генетики.

Генетика бактерий и бактериофагов родилась всего лишь за 10 лет до этого открытия с появлением работы Луриа и Дельбрюка [1] и продолжала развиваться в исследованиях Ледерберга и Татума [2], Дельбрюка, Бейли [3] и Херши [4]. Эта молодая наука уже преподнесла биологам немало сюрпризов. Наиболее важным из них было открытие Эверт, Мак Леодом, Мак Карти [5], а позднее Херши и Чейсом [6] того факта, что носителем генетической специфичности является ДНК. Впервые стало возможным придать старым концепциям наследственности, изменчивости и эволюции некоторый физический и химический смысл. Структурная модель ДНК, предложенная Уотсоном и Криком [7], как раз и была такой молекулярной интерпретацией генетических явлений.

Другим сюрпризом было осознание того, что быстрый рост, способность адаптироваться к самым различным средам и разнообразие механизмов переноса генетической информации делают бактерии и вирусы удобными объектами для изучения функции и репродукции клетки. Работы Бидла и Татума [8], Ледерберга [9] и Бензера [10] показали, что, обладая небольшой долей воображения, можно оказать на популяцию микроорганизмов такое селективное давление, которое позволит почти по желанию изолировать особи, у которых отдельные функции изменились благодаря

мутациям. Действительно, одним из наиболее эффективных способов изучения нормальных механизмов клетки является изучение отклонений от нормы у соответствующим образом отобранных уродов.

Первая попытка генетического анализа лизогении была предпринята в 1952 г. Ледербергом и Вольманом [11, 12]. Определенные скрещивания между лизогенными и нелизогенными бактериями обнаружили некоторую связь между свойством лизогении, определяемым λ -профагом *E. coli*, и другими свойствами, контролируемыми бактериальным геномом. Однако не все скрещивания дали такие результаты. Понятно, что результаты, полученные при этих скрещиваниях, не могли быть правильно интерпретированы, так как в то время еще не был известен механизм конъюгации.

Желая продолжить эти исследования в нескольких иных аспектах, я начал работать с Вольманом. Очень скоро наше сотрудничество стало чрезвычайно тесным и дружеским. Прежде всего мы хотели объяснить отклонения, наблюдаемые при скрещиваниях лизогенных бактерий с нелизогенными, в частности тот факт, что свойство лизогении не передавалось рекомбинантам, за исключением того случая, когда носителем этого свойства был женский штамм. Для исследования этой проблемы мы использовали мутантную мужскую бактерию, незадолго до того изолированную Хейсом, которая называлась *Hfr* (High frequency recombination), потому что при скрещивании ее с женскими штаммами получалось большое количество рекомбинантов [13].

При скрещивании таких лизогенных *Hfr* мужских штаммов с нелизогенными женскими мы, к своему удивлению, обнаружили, что зиготы, образуемые более чем половиной мужских клеток, подвергались лизису, продуцируя фаг [14]. Это явление, названное *зиготной индукцией*, показало, что равновесие между профагом и бактерией поддерживается какой-то регулирующей системой, присутствующей в цитоплазме лизогенной бактерии и отсутствующей в цитоплазме нелизогенной. Более того, оно показало, что генетический признак, переносимый мужской клеткой, может проявляться в зиготе, не будучи включенным в хромосому женской бактерии. Таким образом, стало возможным экспериментально различать в процессе конъюгации перенос генетического материала и рекомбинационное событие.

Чтобы перевести анализ конъюгации с уровня популяции на уровень индивидуальной пары бактерий, нам нужно было разобраться в том, как генетический материал мужской клетки передается женской. В частности, можно было попытаться прервать конъюгацию через различные промежутки времени, чтобы выяснить, когда происходит перенос. Е. Вольману пришла в голову несколько неожиданная идея прервать конъюгацию, поместив спаривающиеся бактерии в один из смесителей, используемых обычно на кухне. Оказалось, что силы, развивающиеся в смесителе, разделяют партнеров. Мужская хромосома разрывается во время перехода, но хромосомный фрагмент, который уже проник в женскую клетку, может проявлять себя и рекомбинировать. Таким путем можно было показать, что после соединения мужская клетка медленно вводит свою хромосому в женскую клетку. Это введение строго упорядочено и у каждого отдельного штамма начинается в одной и той же точке [15].

С помощью этой системы оказалось возможным относительно легко проанализировать генетическую конституцию *E. coli* и установить, что генетические признаки образуют одну группу сцепления, названную бактериальной хромосомой, а также картировать гены этих признаков не только методами классической генетики, но и с помощью физических и химических измерений.

Более того, при этом были обнаружены две новые закономерности. Во-первых, было установлено, что бактериальная хромосома имеет замкнутую (циркулярную) структуру. Во-вторых, оказалось, что эта струк-

гура не столь стабильна, как это можно было ожидать: другие генетические элементы, называемые *эписомами* (например, хромосома фага или половой фактор), могут быть добавлены к ней или изъяты из нее [16].

Эти свойства имели очень большое значение для последующего изучения бактериальной клетки и ее функционирования.

ВЫРАЖЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА: «ПОСРЕДНИК»

Кроме анализа чисто генетических явлений, конъюгация оказалась, в частности, очень удобной системой для изучения функций клетки, так как позволяла ввести в нужный момент любой данный ген в целую популяцию бактерий. Фенотипическое проявление нового гена, введенного в бактерию реципиента, не осложняется такими имеющими место у высших организмов сопутствующими явлениями, как морфогенез и клеточная дифференциация.

В своем конце коридора Моно пришел к заключению, что дальнейший прогресс в понимании механизма ферментативной индукции требует генетического анализа. В то время было известно два типа мутаций, нарушающих индуцированный биосинтез β -галактозидазы. В результате одного типа мутаций клетки лишались способности синтезировать ферментативно активный белок, в результате другого — изменялся характер биосинтеза, который из индуцибельного превращался в *конститутивный*, т. е. способный протекать и в отсутствие β -галактозида. (Последний в случае индуцированного биосинтеза играет роль индуктора.) Чем обусловлен тот или иной характер биосинтеза? Каковы взаимоотношения между генетическими детерминантами, обнаруживаемыми благодаря соответствующим мутациям? Ответ на подобные вопросы можно попытаться получить экспериментально с помощью конъюгации. Используя мужские и женские штаммы бактерий подходящих генотипов, можно передать нужный аллель данного гена в бактерию и затем изучить условия синтеза фермента в зиготе.

Такие эксперименты были выполнены в сотрудничестве с Парди, который приехал на один год в Пастеровский институт [17], и привели к двум новым представлениям. Первое касалось самого механизма индукции. Перенос в конститутивную бактерию генетического фактора, определяющего индуцибельность синтеза фермента β -галактозидазы, приводил к образованию временных диплоидов, гетерозиготных по признаку «индуцибельность/конститутивность».

Очевидно, исходя из фенотипа таких зигот, можно было сделать выбор между различными гипотезами, предложенными для объяснения индукции. Эксперименты показали, что аллель индуцибельности может проявлять себя независимо от гена, контролирующего синтез фермента, причем он доминирует над аллелем конститутивности. Этот результат вскрыл существование специального гена, который контролирует индукцию путем образования цитоплазматического продукта, подавляющего синтез фермента в отсутствие индуктора. Как будет показано ниже, это открытие изменило существующие представления о механизме индукции и позволило провести генетический анализ систем, регулирующих уровень белкового синтеза.

Второе представление касалось функционирования генетического материала. Перенос гена, определяющий структуру некоторого белка, в бактерию, не имеющую его, можно выяснить условия, при которых этот ген проявляет себя в зиготе. В этом случае также можно было ожидать различные результаты в зависимости от природы механизма передачи информации при биосинтезе белка. От анализа кинетики этого синтеза можно было ожидать сведений, касающихся природы первичного генного продукта, времени, требуемого для его синтеза, и способа его действия. Эксперименты показали, что ген, определяющий структуру белка, будучи перенесен-

ным в бактерию еще до рекомбинации, может начать синтезировать белок без заметной задержки и с максимальной интенсивностью.

Это был совершенно неожиданный факт, так как он был несовместим с господствовавшими в то время представлениями. Обычно полагали, что проявление гена состоит в накоплении в цитоплазме стабильных структур, возможно, рибосомной РНК, которая, как предполагалось, служит шаблоном, определяющим структуру белка [18]. Такая схема, которая может быть суммирована известным афоризмом «один ген — одна рибосома — один фермент», едва ли была совместима с немедленным максимально активным синтезом белка.

Для дальнейшего изучения этой проблемы необходимо было извлечь ген из бактерии, чтобы проследить, как это извлечение повлияет на синтез соответствующего белка: стабильные шаблоны, если они присутствуют, должны были осуществлять остаточный синтез. Конъюгация позволяла легко ввести в бактерию отдельный ген; однако извлечение его из целой популяции бактерий оказалось невозможной операцией. Однако можно было перенести сегмент хромосомы, меченный P^{32} ; затем изучаемый ген разрушался вследствие распада P^{32} . Этот тонкий эксперимент был проведен Моникой Рпли в лаборатории А. Парди. Он недвусмысленно показал, что способность производить белок не сохраняется при разрушении гена [19].

Ответ был ясен: проявление гена не может происходить путем образования стабильных шаблонов. Примерно в то же время генетический и химический анализ индукции еще раз подтвердили это предположение. Оказалось, что индукция происходит почти мгновенно и действует на структуры, которые часто определяют биосинтез не одного, а нескольких белков. Это открытие было несовместимо с существовавшими тогда воззрениями еще и потому, что оно не согласовывалось с наблюдаемой гомогенностью рибосом.

Два известных типа РНК не могли выполнять роль цитоплазматического шаблона из-за своей стабильности и гомогенности, а также по составу оснований. А так как представление о том, что синтез белка происходит прямо на ДНК, несовместимо с расположением рибосом в цитоплазме и их ролью в белковом синтезе, оставалась единственная возможная гипотеза: необходимо было предположить существование третьего вида РНК, РНК — «посредника», молекулы с очень коротким периодом жизни, на которую возложена передача генетической информации в цитоплазму (20). Согласно этой гипотезе, рибосомы являются неспецифическими структурами, функция которых заключается в переводе «нуклеинового языка» посредника на «пептидный язык» с помощью транспортной РНК. Другими словами, синтез белка должен протекать в 2 стадии: последовательность дезоксирибонуклеотидов ДНК сначала *транскрибируется* в последовательность рибонуклеотидов «посредника», который является первичным продуктом гена. «Посредник» оседает на рибосомах, принося им специфическую «программу», и последовательность нуклеотидов посредника *транслируется* в последовательность аминокислот. Несмотря на некоторые возражения, гипотеза «посредника» имеет две основные положительные черты: с одной стороны, она позволила объяснить и согласовать целый ряд известных фактов, которые ранее казались несовместимыми, с другой стороны — она позволила поставить ряд точных экспериментов.

Еще до появления в печати эта гипотеза получила два экспериментальных подтверждения. С. Бреннер и я решили провести июнь 1960 г. с М. Мезельсоном, охотясь за «посредником» в лаборатории Макса Дельбрюка в Калифорнийском технологическом институте. Лучшим кандидатом на роль посредника была РНК, обнаруженная Херши [21] и позднее Волкиным и Астраханом [22] у бактерий, инфицированных фагом Т2. Благодаря необычайной живости ума С. Бреннера, удачно сочетающейся с талантом

экспериментатора, мы уже через несколько недель смогли показать, что РНК фага, объединившись с рибосомами, синтезированными *до* инфекции, продуцирует на них белок фага. Таким образом, на одних и тех же рибосомах могут синтезироваться как фаговые, так и бактериальные белки в зависимости от «посредника», с которыми они объединяются. Следовательно, именно «посредник» доставляет рибосомам специфическую программу синтеза [23].

В это время другой член нашей группы, Ф. Гро, уехал на несколько месяцев в Гарвард в лабораторию Уотсона. Скоро ему и его сотрудникам удалось продемонстрировать существование информационной фракции РНК у растущих бактерий и изучить ее свойства [24]. История открытия и изоляции посредника была описана Уотсоном [25].

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЯ: ОПЕРОН

Эксперименты по переносу генетического материала с помощью конъюгации не только заставили пересмотреть взгляды на механизм передачи информации, происходящей в ходе белкового синтеза, но также позволили изучить механизм регуляции этого синтеза.

Наиболее поразительным в изучении двух систем — выделения фага лизогенными бактериями и индукции синтеза β -галактозидазы — было обнаружение необычно высокой степени аналогии между ними. Оказалось, что, несмотря на очевидную разницу между продукцией вируса и синтезом фермента, синтез белка в обоих случаях находится под двойным генетическим контролем: с одной стороны, под контролем *структурных генов*, которые определяют конфигурацию пептидных цепей, а с другой стороны — под контролем *генов-регуляторов*, связанных с этими структурными генами. Свойства мутантов показали, что в обоих случаях действие генов-регуляторов состоит в подавлении выражения структурных генов, которое осуществляется путем образования некоторого цитоплазматического продукта, называемого *репрессором*. Индукция синтеза (фага или фермента) также происходит в результате одного и того же процесса: подавления ингибитора. Таким образом, к нашему удивлению оказалось, что эти два явления, изучавшиеся в разных концах коридора, имеют в своей основе принципиально общий механизм. Следует подчеркнуть, что эта аналогия была неоценимой для нас. В биологии каждый материал имеет свои собственные достоинства и особое значение для каждого определенного вида экспериментов. Объединение двух систем значительно увеличило для нас возможности анализа полученных данных.

Существование специфического ингибитора, репрессора, привело к заключению, что аппарат, синтезирующий белок, должен иметь место, на которое действует этот репрессор, чтобы блокировать синтез. Сам репрессор можно рассматривать, как химический сигнал, посылаемый геном-регулятором. Для восприятия сигнала должен быть рецептор — специфичный и способный мутировать. В системе, которая обеспечивает индуцибельный биосинтез ферментов, подавляя синтез в отсутствие индуктора, любая мутация, повреждающая один из элементов системы «передатчик — рецептор», должна приводить к конститутивному синтезу ферментов. Поэтому было трудно отличать мутации, воздействующие на «передатчик», от мутаций, воздействующих на рецептор, до тех пор пока мы не осознали, что это различие легко осуществить на диплоидах. Приведем в качестве иллюстрации простую аналогию. Рассмотрим дом, в котором открывание каждой из двух дверей контролируется маленьким радиоприемником. Далее, предположим, что где-то поблизости находятся два передатчика, которые посылают одинаковый сигнал, препятствующий открыванию дверей. Если один из этих передатчиков поврежден, другой продолжает посылать сигналы, и двери остаются закрытыми. Поврежденный передат-

чик можно, следовательно, рассматривать как «рецессивный» по отношению к нормальному. С другой стороны, если поврежден один из приемников, он больше не отвечает на сигналы передатчика, и дверь, которую он контролирует (но только эта дверь!), открывается. Поврежденный приемник является таким образом «доминантным» по отношению к неповрежденному. Однако повреждение обнаруживается только с помощью той двери, которую он контролирует. Используя генетическую терминологию, можно сказать, что мы имеем здесь дело с *цис*-эффектом, а не с *транс*-эффектом [26].

Таким образом, в принципе можно, используя диплоидную бактерию, отличать среди конститутивных мутаций мутации, обусловленные повреждением гена-регулятора, и мутации, обусловленные повреждением рецептора. Мутанты фага, соответствующие обоим этим типам, были известны давно, но их природа стала понятной только в свете этой схемы. Существование таких мутаций у фага навело нас на мысль поискать у бактерий аналогичные мутации, воздействующие на ферменты системы лактозы. Очевидно, для этой цели нужны были диплоидные бактерии. Хотя при конъюгации и образуются временные диплоиды, их получение и анализ очень сложны. Однако некоторые наблюдения, сделанные незадолго до этого Адельбергом, показали, что половая эписома F, которая управляет конъюгацией у *E. coli*, может при определенных условиях включать, а затем реплицировать небольшой фрагмент бактериальной хромосомы [27]. Используя серию штаммов, у которых половая эписома была прикреплена к различным точкам бактериальной хромосомы, нам удалось изолировать эписомы, которые включили соседний фрагмент хромосомы. Бактерии, несущие такую эписому, становятся стабильными диплоидами по небольшому генетическому участку, так что легко получить все возможные комбинации аллелей на этом участке [28].

Сконструировав необходимый для анализа генетический инструмент, мы приступили к получению при различных условиях целой серии мутантов, обладающих конститутивным синтезом ферментов системы лактозы, чтобы затем подвергнуть их функциональному анализу. Эти мутанты, как было показано, принадлежали к двум, четко отличающимся группам. Мутанты внутри каждой группы обладали свойствами, предсказанными для случаев повреждения «передатчика» и «рецептора» соответственно.

Многие из этих мутаций оказались рецессивными по отношению к аллелям дикого типа. Они выявили существование «передатчика», т. е. гена-регулятора. Свойства некоторых из этих мутантов привели к прямому обнаружению репрессора, продукта гена-регулятора [29]. Более подробно это обсуждается в лекции Ж. Моно.

Мутанты второй группы оказались доминантными по отношению к дикому аллелю, и только те гены, которые находились в одной и той же хромосоме, т. е. в *цис*-положении, проявлялись конститутивно. Эти мутации позволили обнаружить рецептор репрессора, названный *оператором* [30].

В результате изучения этих мутантов возникло представление о том, что у бактерий генетический материал организован в единицы активности, названные *операонами*, часто более сложные, нежели ген, представляющий собой единицу функции. Действительно, в системе лактозы известно три белка; три гена, управляющие их структурой, располагаются рядом друг с другом на небольшом участке хромосомы с оператором на одном конце (рис. 1). Конститутивные мутации, обусловленные изменением как оператора, так и регулятора, всегда обнаруживают замечательное свойство плейотропии, т. е. они воздействуют одновременно и в одинаковой степени на все три белка. Регуляторная цепь должна, следовательно, действовать, как единая структура, содержащая информацию, которая определяет последовательность аминокислот этих трех белков. Этой структурой могла быть только или сама ДНК, или «посредник», общий для всех трех генов.

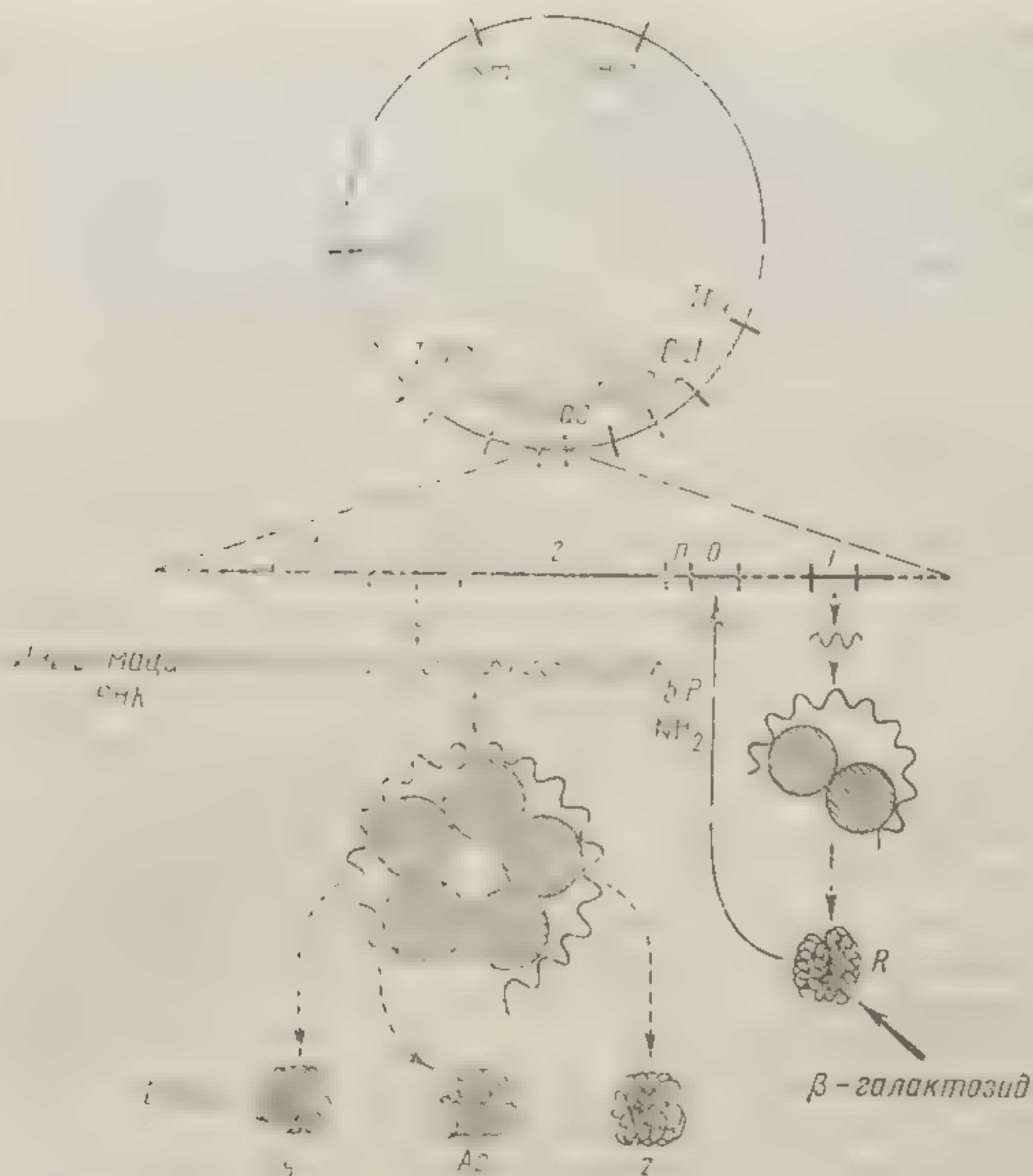


РИС. XI-1.

Лактозная область *E. coli*

Окружность изображает хромосому *E. coli* и положение лактозной области (*Lac*) среди других [маркеров]. Внизу область *Lac* изображена в увеличенном [виде: *i* — ген-регулятор; *o* — оператор; *p* — промотор; *z* — структурный ген β-галактозидазы; *y* — структурный ген β-галактозидпермеазы; *Ac* — структурный ген β-галактозидтрансацилазы. Структурные гены синтезируют, по-видимому, только одну мРНК (3'-Р-конец которой, вероятно, обращен к оператору). При соединении мРНК с рибосомами образуется полисома, на которой протекает синтез различных [пептидных] цепей (N-конец, очевидно, соответствует участку, примыкающему к оператору). Ген-регулятор образует специфический репрессор, который, действуя на уровне [оператора], блокирует образование мРНК, а тем самым [и] белков. β-галактозидные индукторы, взаимодействуя с репрессором, инактивируют его, [благодаря] чему обеспечивается образование мРНК, а следовательно, и белков, контролируемых данным опероном

Дальнейшее подтверждение эта идея получила благодаря фактам, которые наблюдались при мутациях, воздействующих на структурные гены системы лактозы. В то время как некоторые из этих мутаций подчинялись правилу Бидла и Татума «один ген — один фермент» в том смысле, что они нарушали только один из трех биохимических процессов, другие не подчинялись этому правилу, воздействуя на несколько генов одновременно [31, 32].

Понятие об опероне как о группе смежных генов, контролируемых общим оператором, объясняло, почему гены, определяющие ферменты одного и того же биохимического процесса, почти всегда находятся у бактерий рядом, как наблюдали Демерец и Гартман [33]. Кроме того, оно объяснило согласованность производства ферментов, обнаруженную в некоторых биохимических процессах [34]. Хотя сначала концепция оперона

основывалась исключительно на генетических критериях, теперь она включает также биохимические критерии. Имеется ряд экспериментальных данных, как генетических [32, 35], так и биохимических [36], свидетельствующих в пользу того, что оперон вырабатывает единый «посредник», который оседает на рибосомах и образует ряд полипептидных цепей, определяемых различными структурными генами оперона.

Следовательно, мы можем представить себе действие генома *E. coli* следующим образом. Проявление генетического материала требует постоянного притока нестабильных «посредников», которые диктуют рибосомам специфический состав белков, подлежащих синтезу. Генетический материал состоит из оперонов, каждый из которых содержит один или более генов. Каждый оперон дает начало одному «посреднику». Активность оперона подавляется регуляторными «петлями», состоящими из трех элементов: ген-регулятор, репрессор, оператор. Специфические метаболиты действуют на уровне этих «петель» и играют роль сигналов, которые в индукционных системах инактивируют репрессор и, следовательно, допускают образование «посредника» и в конечном счете белка, а в репрессивных системах активируют его и, следовательно, блокируют образование «посредника» и белка. Согласно этой схеме, только часть генов клетки может действовать в каждый данный момент, тогда как другие остаются зарепрессированными. Сеть специфических, генетически детерминированных циклов избирает в каждый данный момент определенные сегменты ДНК, подлежащие транскрипции в «посредник» с последующей трансляцией в белки в соответствии с действием химических сигналов, приходящих из цитоплазмы и окружающей среды.

Представление о генетическом материале как о линейно упорядоченной последовательности оперонов, чья активность регулируется особыми участками-операторами, сразу же дало возможность сделать предсказание, поддающееся точной экспериментальной проверке: если в результате хромосомной перестройки какие-либо структурные гены отделятся от своего оператора и присоединятся к другому оперону, управляемому другим оператором, то их активность должна подчиниться новой системе регуляции. Но в течение некоторого времени не было возможности провести подобный эксперимент: в результате определенных мутаций некоторые гены удалось отделить от их операторов, однако эти гены оказались прикрепленными к неидентифицированному участку хромосомы и подчинялись неизвестной системе регуляции [37, 38].

Только недавно, используя бактерии, диплоидные по выбранному участку, удалось получить слияние оперона лактозы с другим известным опероном *E. coli* [39]. Число известных локусов на бактериальной хромосоме пока невелико; еще меньше мы знаем таких генов, чья активность может изменяться под действием внешних метаболитов. Любая делеция, которая объединяет два таких района, вероятно, затронет относительно большой участок хромосомы и, следовательно, может включить ген, необходимый для роста или деления. У гаплоидной бактерии такая делеция будет, естественно, летальной. С другой стороны, у диплоидной бактерии удалось изолировать целую серию делеций, охватывающих от 50 до 80 генов. С одного конца эти делеции завершаются в районе гена, контролирующего структуру β -галактозидазы, а с другого — различными участками хромосомы. Некоторые из делеций оканчиваются в одном из двух цистронов, принадлежащих пуриновому оперону, оставляя второй цистрон нетронутым (рис. 2). У этих мутантов синтез двух белков лактозного района, определяемых двумя генами, незатронутыми делецией, больше не индуцируется β -галактозидами. Такой результат не является неожиданным, так как делеция разрушила оба элемента (регуляторный ген и оператор), ответственные за специфическую регуляцию системы лактозы. В то же время синтез этих белков репрессируется при добавлении пуринов. Отсюда ясно,

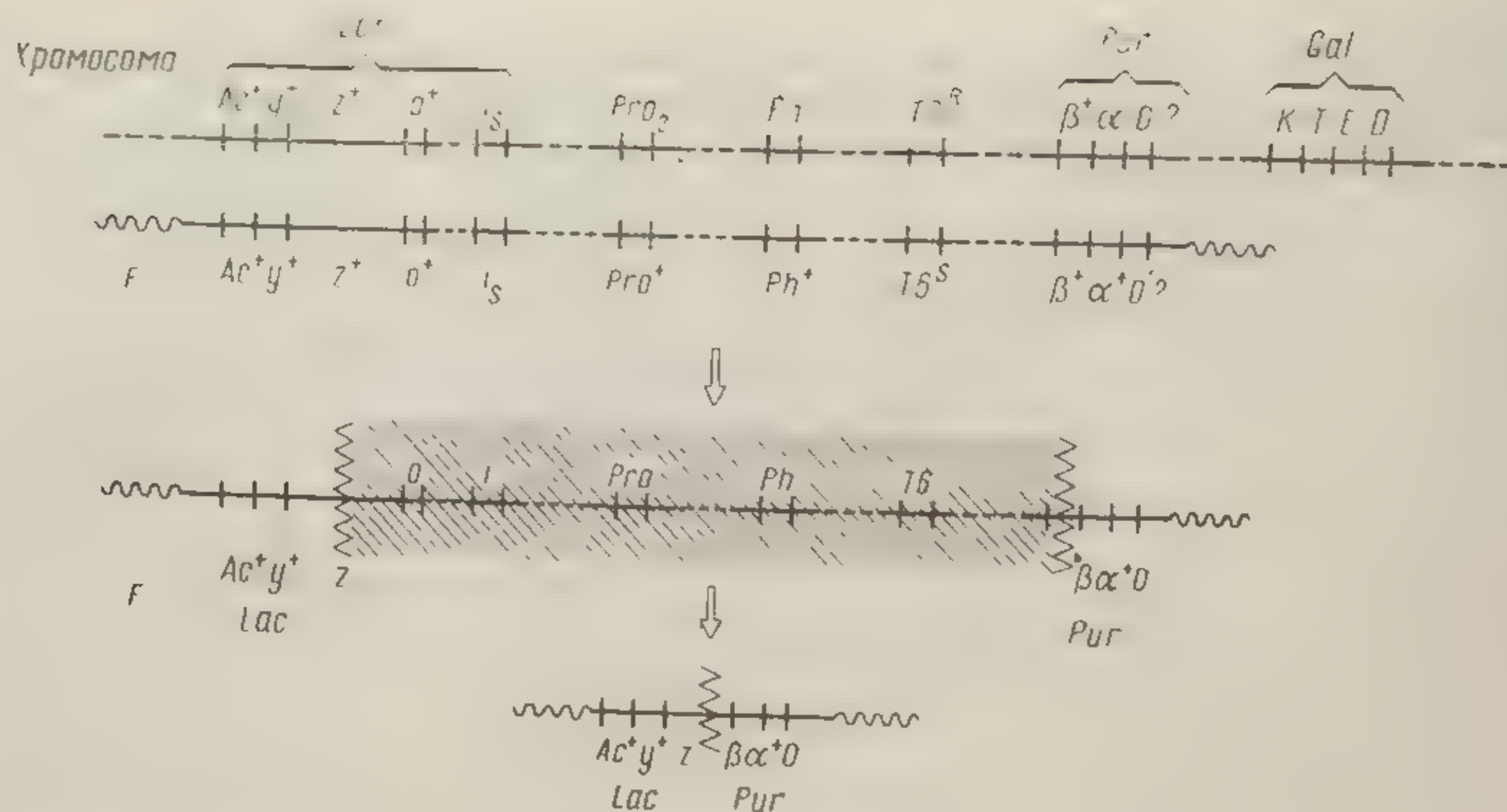


Рис. XI-2.

Делеция, соединяющая фрагмент лактозного оперона с фрагментом пуринового оперона у *E. coli*.

В верхней части схемы изображена диплоидная гетерозиготная структура, возникшая в результате включения значительного фрагмента хромосомы в половую эписому путем рекомбинации. Затрихованный участок в средней части схемы изображает зону, затронутую делецией в эписоме. Нижняя часть схемы изображает структуру, образовавшуюся в результате делеции. Последняя соединила концевой фрагмент гена *z* (контролирующего β -галактозидазу) с начальным фрагментом гена *Pur* β (контролирующего один из ферментов биосинтеза пуринов). В результате образовался новый оперон, в который вошли: ген *Pur* α (контролирующий белок, который участвует в биосинтезе пуринов); структура, состоящая из фрагмента гена *z* и фрагмента гена *Pur* β (по всей вероятности, определяющая образование гибридной пептидной цепи, у которой последовательность на N-конце контролируется фрагментом гена *Pur* β , а последовательность на C-конце — фрагментом гена *z*); ген *y* (контролирующий β -галактозидпермеазу) и ген *Ac* (контролирующий β -галактозидтрансацилазу). Проявление оперона подавляется пуринами, вероятно, на уровне пуринового оператора; последний чувствителен к репрессору, специфически активируемому пуринами [39]

что благодаря делеции фрагмент лактозного оперона соединился с фрагментом пуринового оперона и в результате образовался новый оперон, который, по всей вероятности, образует единый «посредник», содержащий генетическую информацию для синтеза двух разных типов белков, участвующих как в биосинтезе пуринов, так и в использовании лактозы. Но регуляция синтеза этого информатора должна осуществляться оператором пуринового оперона, чувствительным к репрессору, активируемому пуринами.

Недавно с помощью того же метода были изолированы делеции, объединяющие лактозный оперон с опероном, контролирующим биосинтез триптофана [40]. Выражение генов лактозного оперона, не затронутых делецией, стало репрессироваться триптофаном; таким образом, тип регуляции, которому подчиняется выражение генов, принадлежащих к данному оперону, целиком зависит от оператора, т. е. от последовательности нуклеотидов, расположенных на проксимальном конце оперона. При этом не только природа метаболитов, от которых зависит регуляция, но и сам характер этой регуляции (индуцибельный или репрессивный) определяется относительным положением генов на хромосоме и в особенности их связью с определенным оператором. Очевидно, только связи, наиболее благоприятные для организма, сохраняются отбором.

Существование единиц активности регуляции, построенных в виде полицистронных оперонов, предполагает наличие в нуклеиновом тексте двойной системы пунктуации. Одна система пунктуации предназначена для расчленения длинной двойной цепи ДНК на транскрибируемые сег-

менты, соответствующие оперонам: она обеспечивает процесс узнавания РНК-полимеразой тех точек, которые указывают, с какого места она должна начинать и где должна кончить считывание оперона, а также какую цепь ДНК ей надлежит считывать. При определенных условиях можно переместить лактозный оперон в другой участок хромосомы; эти вставки при внедрении в новое место могут быть ориентированы по-разному [40]. Следует отметить, что в случае инверсии из-за 3',5'-полярности нитей ДНК последовательность, транскрибируемая в «посредник», должна измениться не только в отношении направления, но также в отношении нити ДНК, подлежащей считыванию (рис. 3). Однако при всех полученных перестановках лактозного оперона его проявление не зависит от того, произошла ли инверсия или нет. Следовательно, следует принять, что 1) вся генетическая информация *E. coli* не обязательно содержится в одной и той же нити ДНК; 2) генетический сигнал должен указывать не только начало оперона, но и направление считывания; 3) другой сигнал должен отмечать конец оперона. Если 2 оперона противоположной ориентации находятся в смежном положении, то при отсутствии сигнала «конец транскрипции» считывание одного оперона может продолжиться вдоль другого, при этом будет считываться та нить ДНК, которая в норме не подлежит считыванию.

С помощью второй системы пунктуации осуществляется расчленение «посредника» на участки, соответствующие различным пептидным цепям, определяемым генами данного оперона. Эта пунктуация служит сигналом для системы трансляции (рибосомы, тРНК и т. д.), разграничивающим amino-(N) и карбоксильный (C) концы каждой пептидной цепи.

Анализ серии делеций в системе лактозы *E. coli* показал, что оператор расположен вне первого известного структурного гена оперона [41, 38]. От оперона он отделяется неким участком, названным промотором, который совершенно необходим для деятельности всего оперона [37]. Промотор, возможно, соответствует одной из систем пунктуации для транскрипции или трансляции. Есть основания полагать, что сам оператор не транслируется в пептидную цепь, но мы еще не знаем, транскрибируется ли он в «посредник» и на каком уровне действует репрессор: на уровне «посредника» или на уровне самой ДНК (рис. 4). Невозможно обсудить здесь

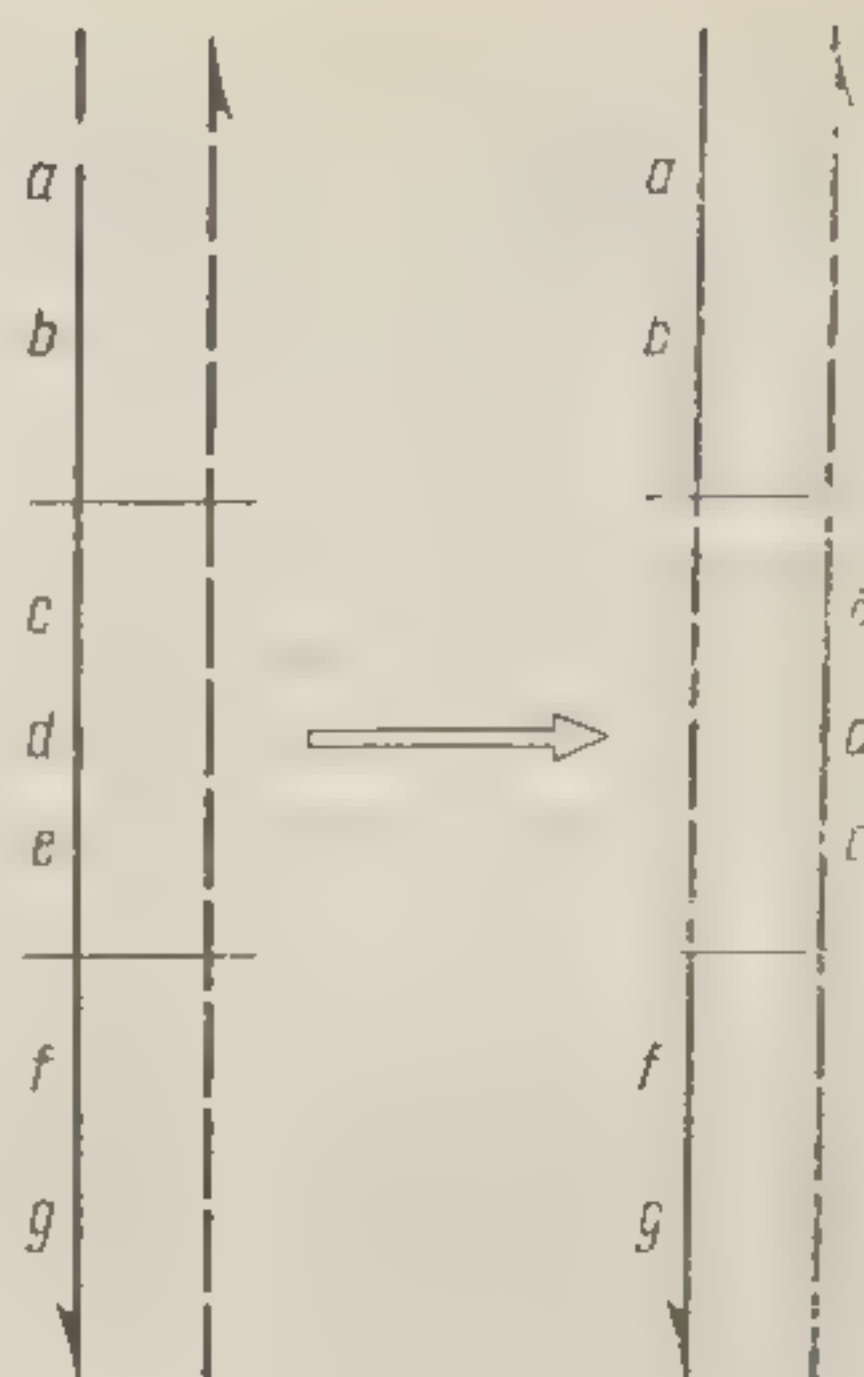


РИС. XI-3.

Схема изменения нити ДНК, подлежащей считыванию, вследствие изменения полярности при инверсии

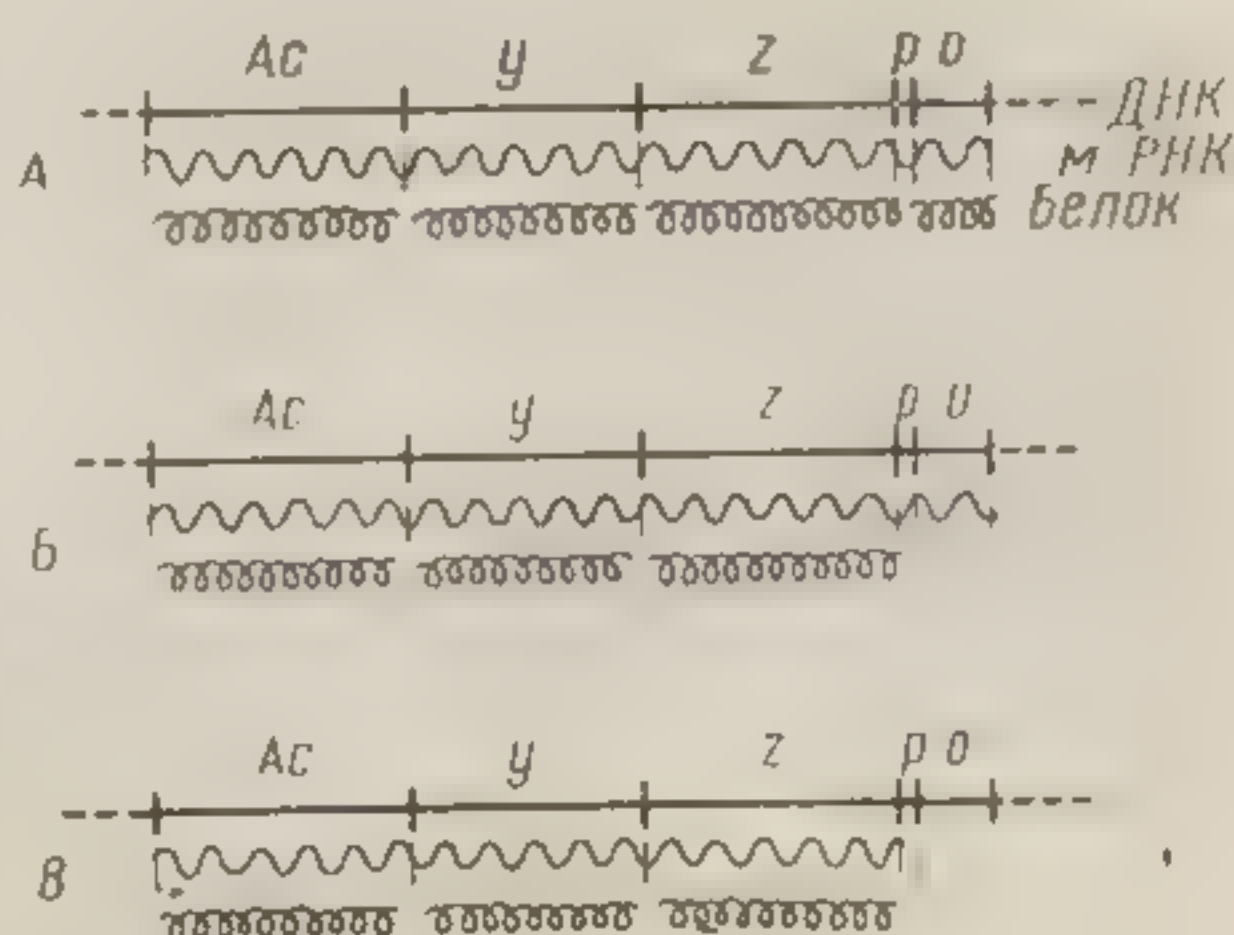


РИС. XI-4.

Три возможных механизма действия оператора.

A — оператор (o) транскрибируется и транслируется в белок; B — оператор транскрибируется, но не транслируется; B — оператор не транскрибируется и не транслируется. Очевидно, что в зависимости от механизма действия оператора репрессор может действовать на уровне белка, мРНК или самой ДНК

подробно экспериментальные данные и гипотезы [20, 32, 42], касающиеся места действия репрессора. Однако сходство результатов, полученных недавно в различных лабораториях [43], показывает, что синтез «посредника» с его 5'-фосфатного конца, так же, как синтез первой пептидной цепи с ее N-конца, начинается с того конца оперона, где находится оператор. Простейшая гипотеза, хорошо согласующаяся с результатами генетического анализа (в частности, с изучением делеций, охватывающих различные сегменты в районе оператора), предполагает, что промотор соответствует транскрипционной пунктуации, обеспечивающей для РНК-полимеразы сигнал начала синтеза «посредника» для этого оперона на одной из двух цепей ДНК; в таком случае оператор не транскрибируется в «посредник», а репрессор может действовать только на уровне ДНК. Это объяснение кажется теперь наиболее вероятным для генетика, но ясно, что, как обычно, последнее слово будет принадлежать химикам.

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ: РЕПЛИКОН

Генетический анализ вскрыл логику процессов, вовлекаемых в регуляцию белкового синтеза, показав, что эти процессы складываются из элементов, которые могут связываться различным образом в соответствии с потребностями клетки. Разумно было бы предположить, что аналогичные процессы, построенные на тех же принципах и использующие сходные элементы, могут принимать участие и в других видах клеточной регуляции, в частности, в управлении репликацией ДНК согласованно с клеточным делением.

Системы, участвующие в репликации ДНК, действуют в клетке, вероятно, более сложным образом, чем когда они изолированы в пробирке. Имеется ряд экспериментальных доказательств в пользу полуконсервативного механизма репликации, предсказанного Уотсоном и Криком на основе их модели. Благодаря работам Корнберга [44] и его сотрудников стал известен фермент, полимеризующий дезоксирибонуклеотиды в порядке, который диктует ему участок ДНК, служащий шаблоном. Однако если фрагмент бактериальной ДНК переносится в реципиентную бактерию при трансформации или неполной конъюгации, то этот фрагмент сам по себе не способен к репликации. Он может реплицироваться только после его интеграции с какой-либо генетической структурой бактерии-хозяина в результате рекомбинации. Структуры, в которые организована ДНК бактерии, значительно проще соответствующих структур, имеющих у высших организмов. Вся основная информация о росте и делении бактерии сосредоточена в одной из этих структур, именуемой бактериальной хромосомой. Кроме того, в бактериальной клетке могут находиться менее существенные структуры — эписомы [16].

Различные работы показали, что наиболее хорошо изученный из этих элементов — хромосома ведет себя генетически, биохимически и структурально как отдельный, составляющий единое целое элемент. Она состоит, вероятно, из одной двойной цепи ДНК, возможно, сомкнутой в виде кольца [45]. Репликация начинается в одной определенной точке молекулы и распространяется затем вдоль хромосомы до тех пор, пока не достигнет опять этой начальной точки [45, 46]. В нормальных условиях роста новый цикл репликации не может начаться до завершения предыдущего [47].

Хотя другие генетические элементы бактерий менее хорошо изучены, их свойства, вероятно, аналогичны. Таким образом, генетический аппарат бактерии можно представить себе как систему, состоящую из отдельных структур, каждая из которых построена из «молекулы» ДНК той или иной длины, имеющей кольцевую структуру.

Бреннер и я попытались объяснить регуляцию синтеза ДНК с помощью процессов, сходных с процессами, осуществляющими контроль белкового синтеза [48]. Для этого нам пришлось предположить, что каждая гене-

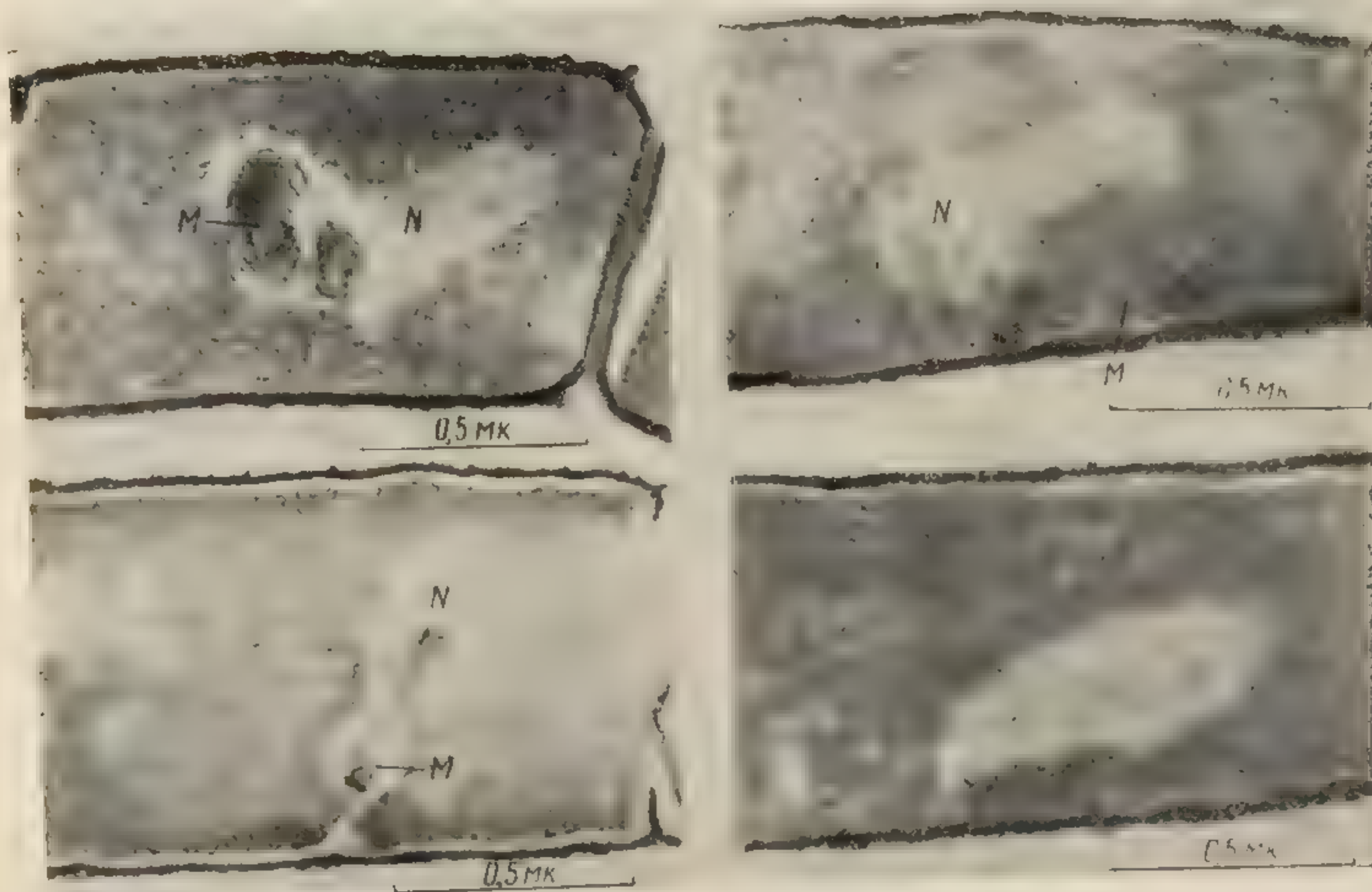


РИС. XI-5.

Слева: срезы *B. subtilis*; нуклеоид прикреплен к мембране при помощи мезосомы (M).
Справа: срезы *B. subtilis*, помещенные на 30 мин в 0,5M раствор сахарозы; мезосомы «вытолкнуты» из цитоплазмы; сократившись, они потянули за собой нуклеониды (N); при этом обнаруживается, что они, по-видимому, непосредственно соединены с клеточной мембраной [50]

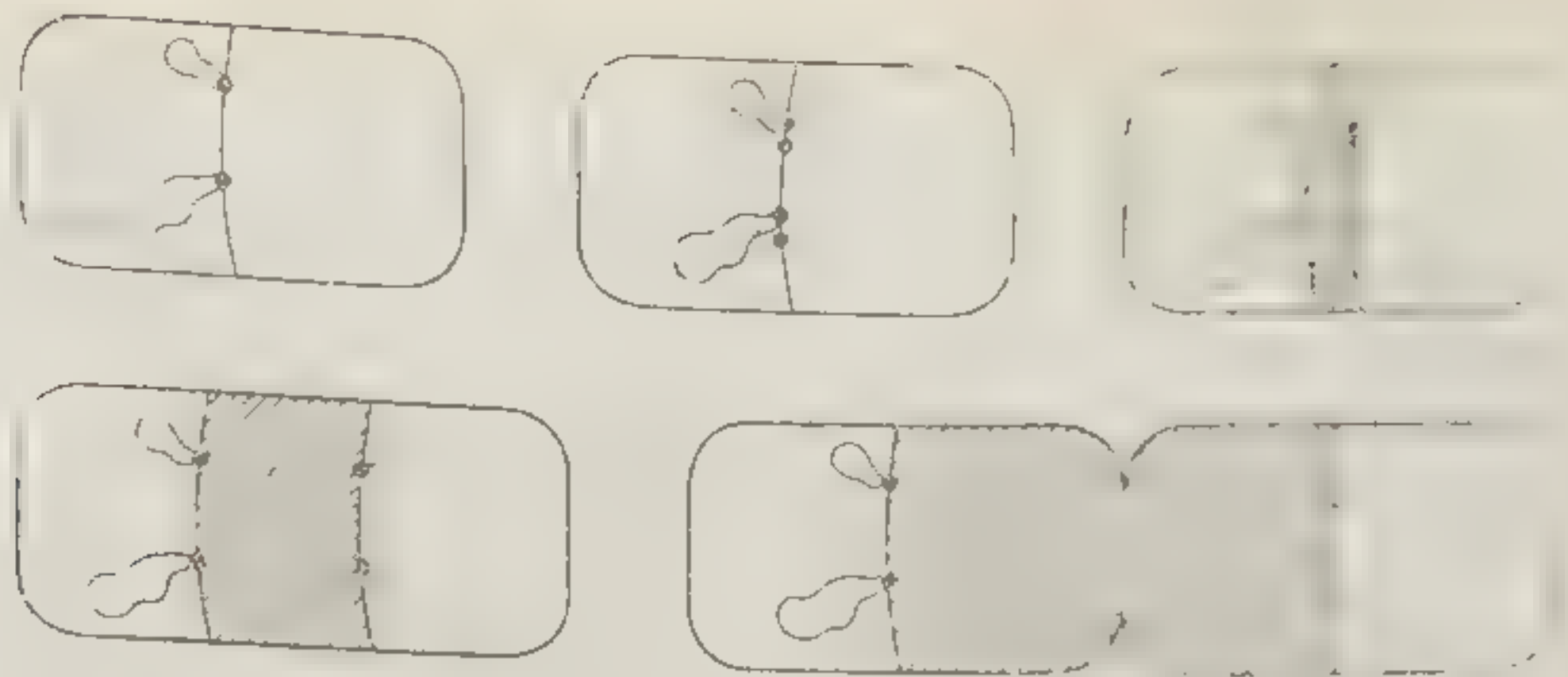


РИС. XI-6.

Схема репликации ДНК у бактерий

Бактериальная клетка содержит две независимые единицы: «хромосому» и половую эписому F. Эти два репликона прикреплены к мембране в двух различных участках. На определенном этапе цикла деления мембрана передает каждому репликону сигнал о начале репликации. Репликация развивается линейно, причем каждый репликон медленно поворачивается перпендикулярно мембране, в которой, как полагают, находится ферментный комплекс, ответственный за репликацию. В результате образуются два экземпляра каждого репликона, прикрепленные к мембране друг возле друга. Синтез мембраны начинается, вероятно, между точками прикрепления каждого репликона. Последние расходятся (при этом в противоположные стороны), а между ними образуется перегородка. Новый цикл репликации не начинается до тех пор, пока мембрана, восстановившая свое первоначальное состояние после деления клетки, не пошлет новый сигнал. Процесс изложен со следующими упрощениями: (1) так как репликация ДНК на один цикл опережает деление, клетка в действительности содержит от 2 до 4 нуклеондов (а не от 1 до 2); (2) каждый этап заканчивается до того, как начнется следующий [48]

тическая структура составляет единицу репликации, или репликон, который содержит генетические детерминанты, контролирующие его собственную репликацию. Исходя из этой гипотезы, можно предсказать:

1. Если каждый элемент содержит какие-то генетические детерминанты, регулирующие его собственную репликацию, то должны существовать мутанты, у которых эта регуляция нарушена. Действительно, для всех трех изученных структур — бактериальной хромосомы, половой эписомы и фага — можно получить мутации, которые нарушают репликацию мутировавшего элемента и не затрагивают репликацию остальных [49]. Природа и свойства этих мутаций показывают, что они каким-то образом изменяют некий диффундирующий продукт, который в форме воздействует на пунктуацию репликона, т. е. на определенную последовательность нуклеотидов, запускающую процесс репликации. Как только реакция начинается, система реплицирует всю последовательность, прилегающую к этой пунктуационной отметке. Но если при синтезе белков регуляция является, по всей вероятности, негативной или репрессивной, то при синтезе ДНК, как показывают имеющиеся данные, она включает позитивные элементы, т. е. такие, которые, действуя на ДНК, запускают репликацию.

2. Особенности конъюгации бактерий легче всего объяснить, если признать, что половая эписома прикрепляется к бактериальной мембране вблизи зоны, через которую во время конъюгации проходит мужская хромосома. Далее, чтобы объяснить, как происходит отделение ДНК после репликации и распределение двух копий ДНК по дочерним бактериям, образующимся в результате клеточного деления, проще всего предположить, что все клеточные репликоны прикрепляются к бактериальной мембране. Именно синтез мембраны между точками присоединения двух копий ДНК обеспечивает их нормальную сегрегацию.

Работы А. Райтера по электронной микроскопии нуклеондов у *Bacillus subtilis* [50] подтвердили правильность этого предположения. Каждый из этих нуклеондов кажется прикрепленным к «мезосоме» (структуре, образованной впячиванием мембраны; рис. 5 и 6). Более того, окрашивая мембрану одной из солей теллура, можно показать, что синтез мембраны идет равномерно по всей поверхности клетки, а происходит преимущественно в зонах, ограниченных точками прикрепления нуклеондов. Таким образом, вероятно, именно рост мембраны обеспечивает отделение и расхождение структур, образующихся в результате репликации. Наконец, Ф. Кузен показал, что такие два независимых репликона, как хромосома и половой фактор, не расщепляются независимо во время деления бактерии [51], а остаются связанными. Вероятно, обе эти структуры связаны с одним и тем же элементом, возможно с одним и тем же участком мембраны, который остается неизменным в течение роста и деления клетки и, следовательно, образует истинную единицу расщепления, аналогичную хромосоме высших организмов.

3. Чтобы объяснить согласованность между репликацией ДНК и ростом и делением бактериальной клетки, нужно принять, что репликация ДНК и ее регуляция осуществляется на мембране. Об этом свидетельствуют некоторые явления, наблюдаемые в ходе конъюгации бактерий: в момент слияния мужской и женской клеток (по всей вероятности, в результате реакции, происходящей на их поверхности) в мужской клетке каким-то образом включается цикл репликации. Одна из структур, синтезируемых в результате репликации, остается в мужской клетке, а другая постепенно, по мере ее формирования, переносится в женскую [52]. В дальнейшем представление о том, что синтез ДНК происходит на мембране, получило некоторые биохимические подтверждения [53].

Таким образом, мы приходим к заключению о том, что генетический аппарат бактерии состоит из кольцевых молекул ДНК, представляющих собой независимые единицы репликации. Эти структуры присоединяются к элементам клеточной мембраны; последняя управляет их репликацией в строгом согласовании с ростом клетки, которое обеспечивается системой регуляции. Основная генетическая информация содержится в самом большом репликоне, но к ней может подключаться дополнительная информация путем прикрепления к мембране других репликонов. Возможно, что один из наиболее важных этапов перехода от клеточной организации прокариотов к таковой эукариотов состоял во впячивании мембраны с последующей дифференциацией специализированных органелл (митохондрий, генетического аппарата), чьи функции первоначально выполняла клеточная мембрана.

Замечательно, что изучение бактериальной клетки привело нас к признанию за мембраной столь важной роли в координации роста и деления клетки, тогда как подобные заключения уже были сделаны при изучении клеток высших организмов. Морфогенез и явления, связанные с межклеточными контактами, указывают на то, что у высших организмов клеточная поверхность также должна контролировать размножение клеток посредством сигналов, исходящих от нее и передаваемых тем или иным путем в ядро. Несмотря на очевидную сложность этих клеток по сравнению с бактериальными, мы должны признать, что эволюция сохранила систему молекулярной связи между клеточной поверхностью и ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Две химические функции ДНК (транскрипция, т. е. копирование одной ее нити в последовательность рибонуклеотидов, и репликация, т. е. копирование обеих нитей в последовательность дезоксирибонуклеотидов) контролируются системой специфических молекулярных взаимодействий, определяемых генами. Таким образом, информация, записанная в генети-

ческой
прогр
ее вы
Во
заклю
и цито
можно
рована
только
и генет
кого м
лось в
ванный
веществ
и, след
может
га [54]
ние ре
просты
а механ
вательн
с текст
нужно
формац
результ
среды.

Разу
ние регу
молекул
регуляц
изолиро
жет фор
Мы не з
и объеди
клеточн
как моле
дей. Одн
шить био
химии и

ЛИТЕРАТУРА

1. S. E. L.
2. J. Leder
3. M. Del
11, 33.
4. A. D.
5. O. T. A
6. A. D. B
7. J. D. M
8. G. W. B
9. J. Leder
1950, 3,
10. S. Benze
Baltimor
11. E. M. L
12. E. L. W

ческом материале, содержит не только структурный план клетки, но и программу координирования синтетических процессов, а также средства ее выполнения.

Возможно, самое ценное из сделанного генетикой микроорганизмов заключается в решении старой проблемы взаимодействия между генами и цитоплазмой и между наследственностью и окружающей средой. Невозможность наследования приобретенных признаков была продемонстрирована еще классической генетикой, однако объяснить этот факт удалось только теперь благодаря раскрытию природы нуклеиновой информации и генетического кода. С другой стороны, ясно, что проявление генетического материала подвержено внешнему влиянию. Десять лет назад еще казалось возможным, что при определенных процессах (таких, как индуцированный биосинтез ферментов или автител) присутствие специфических веществ может модифицировать синтез белков, определять их структуру и, следовательно, изменять их свойства. Окружающая среда, казалось, может оказывать «инструктивное» действие на гены (выражение Ледерберга [54]) и, следовательно, изменять смысл генетического текста. Исследование регуляторных процессов показало, что эти вещества служат лишь простыми стимуляторами: они действуют на сигналы начала синтеза, а механизм и конечный продукт синтеза полностью определяются последовательностью нуклеотидов ДНК. Если нуклеиновое сообщение сравнить с текстом книги, то регуляторная система определяет, какую страницу нужно читать в каждый данный момент. При реализации генетической информации (так же как и при ее репродукции) адаптация является скорее результатом селективного, а не инструктивного действия окружающей среды.

Разумеется, генетический анализ может только указать на существование регуляторных связей. Для того чтобы раскрыть те специфические молекулярные взаимодействия, на основе которых осуществляется эта регуляция, необходим химический анализ этих явлений. Еще не было изолировано ни одного репрессора, и природа комплексов, которые он может формировать с оператором или метаболитами, остается неясной. Мы не знаем, как молекулы находят друг друга, как узнают друг друга и объединяются для создания регуляторной системы или образования таких клеточных структур, как мембрана, митохондрии, хромосомы. Мы не знаем, как молекулы передают сигналы, которые изменяют активность их соседей. Однако ясно, что проблемы, которые должны в ближайшие годы решить биология клетки и генетика, все более сливаются с проблемами биохимии и физической химии.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. E. Luria a. M. Delbrück. *Genetics*, 1943, 28, 499.
2. J. Lederberg a. E. L. Tatum. *Nature*, 1946, 158, 558.
3. M. Delbrück a. W. T. Bailey. Jr. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1946, 11, 33.
4. A. D. Hershey. *Ibid.*, p. 67.
5. O. T. Avery, C. M. McLeod, M. McCarthy. *J. Exp. Med.*, 1944, 79, 137.
6. A. D. Hershey and M. Chase. *J. Gen. Physiol.*, 1952, 36, 39.
7. J. D. Watson and F. H. C. Crick. *Nature*, 1953, 171, 737.
8. G. W. Beadle and E. L. Tatum. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1941, 27, 499.
9. J. Lederberg. In: «Methods in Medical Research», J. H. Comroe, Jr. (Ed.) Chicago, 1950, 3, p. 5.
10. S. Benzer In: «The Chemical Bases of Heredity», W. D. McElroy a. B. Glass (Eds). Baltimore, 1957, p. 70.
11. E. M. Lederberg and J. Lederberg. *Genetics*, 1953, 38, 51.
12. E. L. Wollman. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, 281.

13. W. Hayes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1953, 18, 75.
14. F. Jacob and E. L. Wollman. Compt. Rend., 1954, 239, 455.
15. E. L. Wollman and F. Jacob. Ibid., 1955, 240, 2449.
16. F. Jacob and E. L. Wollman. Sexuality and the Genetics of Bacteria. N. Y., 1961.
17. A. B. Pardee, F. Jacob, J. Monod. J. Mol. Biol., 1959, 1, 165.
18. T. Caspersson. Chromosoma, 1940, 1, 562; J. Brachet. Enzymologia, 1941, 10, 87; F. H. C. Crick. Symp. Soc. Exp. Biol., 1958, 12, 138; R. B. Roberts. Microsomal Particles and Protein Synthesis New York, 1958; A. Tissières, J. D. Watson, D. Schlesinger, B. R. Hollingworth. J. Mol. Biol., 1959, 1, 221; C. I. Davern a. M. Meselson Ibid., 1960, 2, 153.
19. M. Riley, A. B. Pardee, F. Jacob, J. Monod. J. Mol. Biol., 1960, 2, 216.
20. F. Jacob a. J. Monod. Ibid., 1961, 3, 318.
21. A. D. Hershey, J. Dixon, M. Chase. J. Gen. Physiol., 1953, 36, 777.
22. E. Volkin a. L. Astrachan. Virology, 1956, 2, 149.
23. S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson. Nature, 1961, 190, 576.
24. F. Gros, W. Gilbert, H. Hiatt a. oth. Ibid., p. 581.
25. J. D. Watson. In: Les Prix Nobels en 1962. Stockholm, 1963, p. 155.
26. G. Pontecorvo. Advance Enzymol., 1952, 13, 121.
27. E. A. Adelberg a. S. N. Burns. J. Bacteriol., 1960, 79, 321.
28. F. Jacob a. E. A. Adelberg. Compt. Rend., 1959, 249, 189.
29. C. Willson, D. Perrin, M. Cohn a. oth. J. Mol. Biol., 1964, 8, 582; S. Bourgeois, M. Cohn, L. Orgel. Ibid., 1965, 14, 300.
30. F. Jacob, D. Perrin, C. Sanchez, J. Monod. Compt. Rend., 1960, 250, 1727.
31. F. Jacob, J. Monod. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 193; N. Franklin a. S. E. Luria. Virology, 1961, 15, 299.
32. B. N. Ames a. P. Hartman. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 349.
33. M. Demereč a. P. Hartman. Ann. Rev. Microbiol., 1959, 13, 377.
34. B. N. Ames a. B. Gary. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1959, 45, 1453.
35. J. R. Beckwith. In: Structure and Function of the Genetic Material. 1964, p. 119.
36. G. Attardi, S. Naono, J. Rouvière a. oth. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 363; B. Guttman and A. Novick. Ibid., p. 373; R. G. Martin. Ibid., p. 357; S. Spiegelman a. Hayashi. Ibid., p. 161.
37. B. N. Ames, P. Hartman, F. Jacob. J. Mol. Biol., 1963, 7, 23; A. Matsushiro, S. Kido, J. Ito a. oth. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, 9, 204.
38. F. Jacob, A. Ullmann, J. Monod. Compt. Rend., 1964, 258, 3125.
39. F. Jacob, A. Ullmann, J. Monod. J. Mol. Biol., 1965, 13, 704.
40. J. R. Beckwith a. E. Singer. Manuscript in preparation.
41. J. R. Beckwith. J. Mol. Biol., 1964, 8, 427.
42. L. Szilard. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1960, 46, 277; G. S. Stent. Science, 1964, 144, 816; W. K. Maas and E. McFall. Ann. Rev. Microbiol., 1964, 18, 95.
43. R. L. Somerville a. C. Yanofsky. J. Mol. Biol., 1964, 8, 616; G. Streisinger. Mendel Symposium on the Mutational Process, Prague 1965, in press; H. Bremer. M. W. Konrad, K. Gaines, G. S. Stent. J. Mol. Biol., 1965, 13, 540; F. Imamoto, N. Morikawa, K. Sato. Ibid., p. 169; U. Maitra and J. Hurwitz. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 1965, 54, 815; M. Salas, M. A. Smith. W. M. Stanley, Jr., a. oth. J. Biol. Chem., 1965, 240, 3988; R. E. Thach, M. A. Cecere a. oth. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., 1965, 54, 1167.
44. A. Kornberg. In: «Les prix nobel en 1959». Stockholm, 1960, p. 165.
45. J. Cairns. J. Mol. Biol., 1963, 6, 208.
46. N. Sueoka and H. Yoshikawa. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 47; F. Bonhoeffer a. A. Gierer. J. Mol. Biol., 1963, 7, 534.
47. O. Maaløe. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 45; R. H. Pritchard a. K. G. Lark a. J. Mol. Biol., 1964, 9, 288.
48. F. Jacob, S. Brenner, F. Cuzin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 329.

49. M. Kol
F. Cuz
F. Jaco
50. A. Ryt
51. F. Cuz
52. F. D. G
1965, 1
1965, 9
53. A. T. C
824.
54. J. Leder

49. *M. Kohiyama, H. Lamfrom, S. Brenner, F. Jacob. Compt. Rend., 1963, 257, 1979; F. Cuzin a. F. Jacob. Proc. Internat. Congr. Genet. 11th, La Hague, 1963, 1, p. 40; F. Jacob, C. Fuerst, E. L. Wollman. Ann. Inst. Pasteur, 1957, 93, 724.*
50. *A. Ryter a. F. Jacob. Ann. Inst. Pasteur, 1964, 107, 384.*
51. *F. Cuzin a. F. Jacob. Compt. Rend., 1965, 260, 5411.*
52. *F. D. Gross a. L. G. Caro. Science, 1965, 150, 1679; M. Ptashne. J. Mol. Biol., 1965, 11, 829; A. A. Blinkova, S. E. Bresler, V. A. Lanzov. Z. Vererbungsl., 1965, 95, 267.*
53. *A. T. Ganesan a. J. Lederberg. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 18, 824.*
54. *J. Lederberg. J. Cell. Comp. Physiol., 1958, 52 (Suppl. 1), 398.*

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ *

- Автолиз 311
 агар 308, 320, 322
 агглютинация 64, 65
 адаптерная РНК (см. РНК транспортная)
 адаптивная ценность (см. также потенциал размножения) 218, 259
 адениловая кислота 442
 аденил-сукциназа 423
 аденин (6-аминопурин) 271, 272, 277, 297, 404, 408, 409
 — 2-метил 272
 аденозин 405
 — аналоги 466
 аденозинтрифосфат (АТФ) 196, 292—295, 293, 442, 463, 524
 адсорбция 522
Aerobacter 466
 азот 196, 269, 270, 286, 287, 525
 азотистая кислота как мутаген 409
 акридины 332, 337, 340, 369, 407, 450
 активатор 398—400, 399, 414, 470
 актиномицеты 466
 актиномицин Д 377, 440, 444, 506
 алейрон 33, 33, 482
 алкаптон (гомогентизиновая кислота, 2,5-дигидрофенилуксусная кислота) 418, 418, 419
 алкаптонурия 417—420
 аллели 40
 — изоаллели 66, 67, 205, 397
 — множественные 64—69, 68, 72, 204, 489, 491
 — псевдоаллели 491, 492, 492
 — расщепление 38—47
 аллополиплоидия (амфиплоидия) 168, 174, 263—265, 264, 265
 альбинизм 44, 45, 45, 420
 альбумин 512, 515
 альтернативные признаки 40, 42, 64, 268, 295, 312, 490, 491
 амбивалентность 246, 246, 247
 аминокислоты 442
 аминокислоты 270, 271, 271, 420
 аминокислоты 268, 289, 378, 421, 424, 426, 436, 522, 523
 — генетическое кодирование 449—459
 — последовательность 379, 427, 431, 438, 439, 472
 — типы 425
 аммиак 523
 амфибий, генетика развития 512
 амфиплоиды 264, 265, 265
 анализ родословных 44
 анафаза 16, 17, 26, 27, 28
 анемия
 — Кули (большая талассемия) 46
 — микроцитемия (малая талассемия) 46, 56
 — серповидноклеточная 78, 79, 79, 224, 225, 234, 428—431
 антибиотики 236, 320—322, 409, 423
 антигены 64, 65, 309, 373, 374, 514, 515
 антимуагены 404, 405, 414
Antirrhinum (львиный зев) 76, 77
 антисыворотка 64, 65, 309, 344
 антитела 64, 65, 515
 антоциан 482
 антрахионовая кислота 345
 антропология 258
 анеуплоидия 169, 174, 179—181, 186, 238, 263
 анеусомия 169, 172—174, 238, 396, 397, 495
 апуриновая кислота 409
 арабиноза 408
 аргинин 507
 асинапсис 396
Ascaris 21, 203, 396, 397, 414, 505
 аскоспоры и аски 34, 35, 133, 422
 аспарагиновая кислота 522
Aspergillus 491, 514
 атмосфера «первобытная» 522
 ауксотроф 312, 324—327, 343, 421, 422, 473
 ауткросс 162, 163
 аутолизат 326
 аутополиплоидия 164, 165, 174, 263, 266
 ауторепликация 292
 аутосома 97, 495—497
 ахондроплазия (хондродистрофия) 88
 Бабочки 101
 бактерии 286, 287, 307, 308, 400
 — анаэробные 404, 405
 — аэробные 404, 405
 — вегетативное размножение 307, 307
 — генерация 288
 — индуцированные 472
 — клоны 320, 329
 — мутации 320—324
 — неиндуцированные 471
 — посев штрихом 308
 — хозяева 389
 бактериофаг (фаг) 343, 349, 353, 354, 451
 — BF-23 374

* Ссылки на страницы, выделенные полужирным шрифтом, относятся к иллюстрациям.
 Приложения в указателе не отражены.

- вирулентные (неумеренные) 355—357, 375, 389, 513
- генóm 350, 352, 511, 513
- головка 353, 354, 506
- делеция 1589, 451, 452
- единица рекомбинации 362
- зрелый 350, 355, 506
- круг хозяев 355
- лямбда 348—350, 465, 468
- морфогенез 511, 512
- MS2 377, 379, 380
- незрелый 355
- PBS1(PBS2)465
- P1 346
- P2 375
- P22 344, 345, 350, 465
- «помощник» 350
- профаг 344, 349, 355, 468
- R, или R17 353, 377, 467
- развитие в клетке хозяина 354, 355
- репликация 412, 512
- рекомбинация и генетические карты 353—365, 356, 361, 363
- РНК 464
- S13 285, 408
- тени 374
- Т-группа 353—365, 354, 406, 513
- T1 374, 415
- T2 281, 353, 374, 406, 409
- T4 281, 353, 359, 406, 409, 449, 458, 511, 517
- T5 374, 404, 405
- T6 353, 374, 404—406
- типы бляшек 355—357
- умеренные (невирулентные) 344, 350, 355, 362—365, 389, 513
- f2 373, 454, 458, 466
- хвост 353, 354, 374
- X174 280, 285, 299, 353, 369, 370, 410, 415, 439
- барьеры 261
 - географические 261
 - морфологические 261
 - половые и поведенческие 261
 - репродуктивные 266
 - сезонные 261
 - физиологические 261
 - экологические 261
- Basc, метод 212, 213
- Bacillus* 311
 - *megaterium* 440
 - *subtilis* 300, 465
- белки 268, 269, 277, 278, 424, 522, 527
 - BTM 378, 379, 379
 - гистоны 268, 269, 506—508
 - дефектные 444
 - негистоновые 507
 - протамины 268, 269
 - синтез 196, 420, 444, 453, 454, 470, 512
 - эволюция 523
- бензол 269, 270, 419
- β -галактозидазы 471
- β -галактозид-пермеазы 471
- бивалент 24, 26, 28
- биномиальное распределение 535, 546
- биометрия 530—550
- биотин 325, 421
- бластула 512
- близнецы 44
 - идентичные (однорядцевые, монозиготные) 45, 82, 83, 83

- изучение 44, 82—87
- конкордантность
- — по кори 86
- — по полиомиелиту 85
- — по туберкулезу 85
- — по шизофрении 86
- неидентичные (двуяйцевые, дизиготные) 45, 83
- близнецовые пятна 478, 479
- бляшка (стерильное пятно) 355—357
- bobbed (укороченные щетинки) 128, 208, 209, 498
- бобы 10, 11
- Bonellia* 121
- браки кузенов 45, 223, 228, 232, 233
- браки полусибсов 222, 228
- Brachyury, Brachy (короткохвостость), 91, 92
- Валин 428, 453, 454
- вегетативное ядро 32
- Венера 526
- веретено 14
 - аппарат 14
 - нити 14
 - полюс 14
 - форма 513
- экваториальная плоскость 14, 18
- вероятность 144, 147, 534
- Vibrio* 350
- «видимые» мутации 212
- видимый свет 193
- видообразование 260—263
- виды жизнеспособные 262
- виды перекрестно-оплодотворяющиеся 257, 259, 260, 266
- вирус 278, 286, 402, 525 (см. также бактериофаг)
 - болезни Ньюкасла 377
 - желтой мозаики турнепса 353, 377
 - герпеса 402, 514
 - гриппа 377
 - инфекционного ринотрахеита 465
 - как мутагены 401—403
 - кори 514
 - кроличьей оспы 383
 - морфология 353, 354
 - обезьяний SV₄₀ 402, 513
 - осповакцины 281
 - полиомиелита 377, 466, 467
 - полиомы 513
 - провирус 468
 - реовирус 380
 - саркомы Рауса (BCR) 403, 468
 - табачной мозаики (см. BTM)
 - энцефалита 377
- витамин B₁ (тиамин) 421, 433
- Vicia faba* (конские бобы) 466
- внешние условия 9, 78
- водород 270, 271, 521, 522, 525
- водородные (H-) связи 283, 283, 284, 297, 297, 298, 408, 409
- война ядерная 241
- BTM (вирус табачной мозаики) 357, 378—380, 378, 437, 466

- Газон бактериальный 322, 325
- галактозидазы 472
- гамета 13
- гаметогенез 498
- гаметофит 32

гамма-лучи 193
гаплоид (моноплоид) 19, 115, 170
гастрола 512
гексаплоид 164
Hexaptera 163, 163
гелий 525
гем 426, 431
гемагглютинирующие факторы 377
гемизиготность 99, 106, 128, 487
гемоглобин 417, 426—434, 427, 431, 449, 456
— А (A₁) 427—430
— А₂ 429—430
— биохимическая генетика 425—431
— молекулярная эволюция 431—433
— пептидные цепи 427, 431
— F 430
геморрагическая лихорадка 389
гемофилия 102, 102, 149
Hemophilus 311, 363
ген 40, 44, 47, 204, 213, 268, 421
— активатор 399, 400, 470, 477, 481
— аморфные 209
— асинаптический 204
— белых глаз дрозофилы 77, 209, 490, 492
— биполярность 203, 204, 213
— блоки 511, 512
— взаимодействие 56—59, 470—475, 477—484, 485—493, 495—500
— внеядерные (внехромосомные) 368, 383—395, 402
— внутригенная рекомбинация 358—362
— гиноморфные 209, 498
— группы крови АВО 258
— действие и полипептиды 417—435
— действие и регуляция 470—519
— действие и фенотипический эффект 76—96
— диссоциатор 398, 402, 477
— дифференцировка 512, 513
— доза 209, 498
— дозовый компенсатор 495—500
— доминантный 42, 387
— дупликация 431, 432, 432, 493
— идентичный 204, 205, 493
— инактивация 506
— комплексы 245, 246, 246
— красных глаз дрозофилы 77
— летальный 77, 225
— летальной полупрозрачности 78
— модификации 205
— мутатор 397, 403
— неаллельные 492
— неидентичные 204
— неоморфные 209
— нехромосомные 390, 391
— новые 412, 415
— области Лас 471
— оператор 472—474, 525
— первичная функция 425
— примитивный 523
— природа и характер передачи 40
— развитие и действие 87—93, 511, 512
— — человека 115—119, 430, 495—497
— расположение 141—149
— регулятор 399, 470—475, 473, 481, 525
— регуляция синтеза 462—468
— рекомбинационный 128—131, 162, 205
— репрессор 471, 472
— рецессивный 42

- рост и действие 511—517
- селферы 402
- серповидноклеточности 428
- способы обозначения аллельных пар 125, 125
- стабилизатор 400, 401
- старые 408, 412
- структурные 473, 475, 525, 527
- супрессор 473
- сцепление 128—132, 132, 136, 137
- сцепление и перекрест 125
- сцепленные с полом 97—102, 107, 137
- трансформатор 111
- униполярный 203, 204, 213
- фенотипические эффекты 208—210, 481, 485, 486, 511
- функциональный 473, 475, 492, 527
- функциональные формы 498
- химическая природа 268—279
- числа увеличение 186, 187
- юношеской формы амавротической семейной идиотии 220
- генеалогия 44
- генеративное ядро 32, 33
- генерация 307, 324, 513
- генетика биохимическая 96, 417, 420
- популяций 216—228, 231—242
- человека (см. Человек)
- генетика передачи (трансмиссионная) 38
- генетика развития 87
- генетическая отягощенность 231, 232, 234, 238
- генетическая рекомбинация 43, 47, 128—131, 162—164, 383, 470, 492
- и генетические карты 353—365
- и конъюгация 324—329, 328
- наименьшая единица 362
- неаллельных генов 49—59
- при трансдукции 343—351
- при трансформации 309—315
- у бактерий 368—375
- у вирусов, содержащих РНК 377—381
- у фагов 353—365
- частота 148, 334, 359
- генетическая смерть 234—236, 241
- генетическая тонкая структура фага Т 357—362
- генетические обозначения 39, 43, 125
- генетический материал 9—13
- и ДНК 276
- и РНК 377—381
- и хромосомы 105, 106
- происхождение и эволюция 520—527
- фага 353, 354
- генетический фактор 9
- генетическое кодирование аминокислот 449—461 (см. также код генетический)
- генетическое равновесие 216—228
- генный контроль у кукурузы 477—484
- геном 28, 44, 213, 280, 317, 324, 389, 451
- генотип 9—13, 40, 41, 208, 386, 389, 396, 397, 403, 467, 472, 515, 525
- и определение пола 120, 121
- соотношения 41, 42
- генофонд 216—228, 260, 262, 263, 266
- гермафродиты 120
- гетерогаметность 102
- гетерогенота 346, 349
- гетерозигота 41, 46, 188, 189, 387, 428
- гетерозиготность вынужденная 245

гетероз
гетерон
гетероп
гетероп
гетерох
493
гетероц
гибрид
— между
— между
— между
261
— от о
— от дв
гибриди
гинандр
гиперши
гиперши
гипоксан
гипоморф
гипопло
гипостаз
гипофиза
гистидин
гистидине
гистограм
гистоны 2
— ацетил
гистохиме
гифы 34,
глаз 487,
— трансп.
— цвет у
498, 499
глицерино
глицин 42
глобулины
глутамино
глюкоза 4
глюкозо-6-
глюкозо-6-
149, 496
глюкозилтр
Гольджи ал
гомозигота
гомополиме
гомоцистеин
гонада 28, 1
гормоны 91,
горох садов
125—127,
горох душис
«горячие уч
гранулы 392
группы кров
группы сде
— у кукуруз
— у нейросл
— у мыши 1
— число 148
гуанин (2-ам
280—288,
— 1-метил 2
— производн
гуанозин 405
— трифосфат

Datura (дурман)
— плоидность
Дауна синдром
двойное оплод

гетерозис 223—228, 252
 гетерокарион 35
 гетерошизис 500
 гетероплоидия 164—169
 гетерохроматин 397, 399, 401, 402, 486, 493
 гетероцитосома 391
 гибрид 246, 247, 489
 — межвидовые 262—226, 265
 — межлинейные 250
 — нежизнеспособность и стерильность 261
 — от одиночного скрещивания 227
 — от двойного 225, 227
 гибридизация соматических клеток 514
 гинандроморфы 114, 114, 115
 гипершизис 495
 гиперплоидия 181
 гипоксантин 297, 297, 298, 409
 гипоморфы 209, 214
 гипоплоидия 181
 гипостаз 58, 111
 гипофизарная карликовость 91
 гистидин 345
 гистидиновая область у сальмонеллы 347
 гистограмма 546
 гистоны 268, 269, 289, 506—509, 512, 517
 — ацетилирование 508
 гистохимия 274, 281
 гифы 34, 391
 глаз 487, 488
 — трансплантация закладки 434
 — цвет у дрозофилы 67, 102, 488—491, 498, 499
 глицериновый альдегид 523
 глицин 428, 523
 глобулины 508, 515
 глутаминовая кислота 289, 428, 522
 глюкоза 419, 464
 глюкозо-6-фосфатаза 515
 глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г-6-ФД) 149, 496
 глюкозилтрансферазы 465
 Гольджи аппарат 15
 гомозигота 41, 46, 387, 418, 419, 487
 гомополимер 301, 522, 523
 гомоцистеин 442
 гонада 28, 115, 116
 гормоны 91, 117
 горох садовый 18, 38, 40—42, 43, 49, 97, 125—127, 125, 127, 244, 245
 горох душистый 128
 «горячие участки» мутаций 406
 гранулы 392, 503
 группы крови 64—66, 84, 257
 группы сцепления
 — у кукурузы 154
 — у нейроспоры 157
 — у мыши 150
 — число 148
 гуанин (2-амино-6-оксипуридин) 272, 277, 280—288, 297, 298, 409, 503
 — 1-метил 272
 — производные 272
 гуанозин 405
 — трифосфат 444

Datura (дурман) 164, 170, 170
 — плоидность 165, 165
 Дауна синдром 171—173, 173, 185, 186
 двойное оплодотворение 33

двойной рецессив 52, 53
 ДДТ 236
 дезаминирование 409
 дезоксиадениловая кислота 273, 275
 дезоксиаденозин 272, 274
 дезоксигуаниловая кислота 273
 дезоксигуанозин 272, 274
 дезоксирибоза 272, 273
 дезоксирибозидаза (редуктаза) 463
 дезоксирибозиды 272, 273, 274, 275, 295, 296, 412, 462
 дезоксирибонуклеопротамины 508
 дезоксирибонуклеопротейды 278, 506
 дезоксириботиды (дезоксирибонуклеотиды) 272, 273, 274, 275, 406
 дезокситимидин 272
 дезоксицитидиловая кислота 273, 275
 дезоксицитидин 272, 274
 дейтеранопия 149
 деинтеграция 368, 414
 деление парамеций 387
 делеции, или нехватки (см. хромосома)
Delphinium (живокость) 265
 деполимеризация 289
 депуринизация 409
 дерепрессия 475
 диабет 12, 235
 диада 24, 26
 диакинез 25, 26, 27
 дигибрид 52, 52, 422, 429, 489
Didinium 467, 468, 524
 дикий тип 31, 31
 димеры 432
 — в гемоглобине 426
 — тимина 409—411, 410
 — урацила 412
 диплоид 19
Diplococcus 309, 466
 диплонома 24, 25, 26, 27
 дискордантность 85, 85
 дискретные переменные 531—545
 дисомия 169, 172, 173
 диспергирование 18, 19
 диссоциатор 414
 дистрофия мышц, сцепленная с полом 496
 дифракция рентгеновых лучей 282, 284, 310, 441
 дифференцировка у парамеций 516, 517
 диффузная стадия (стадия роста) 25
 дицентр 397, 402
 диэстераза змеиного яда 295, 380
 ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) 269
 — аминокислоты 289
 — бактерий 289, 290, 306, 343, 465, 466, 506
 — биологическая репликация 302, 303
 — вирусов 289, 290, 296, 299, 439
 — вторичная структура 282, 284
 — в хлоропластах 386
 — гибридная по плотности 287, 287, 288
 — глюкоза 463, 465
 — гомологичная 343
 — двойная спираль 282, 284, 285, 289, 292, 507
 — денатурация 288, 316, 350, 437, 442, 507, 509
 — деспирализация 503
 — динуклеотидов последовательность 299—301

- дупликация 307
- измерение количества 274, 275
- и трансдукция 343—351
- и трансформация 309—318, 521
- как генетический материал 276, 278, 311, 318, 524, 527
- как матрица 286, 292, 298, 317, 407, 436—439, 462, 506—509
- как трансформирующий агент 310
- количество и распределение 276, 278
- краба 301
- легкая 287, 287, 288
- лейкоцитов 289
- локализация 268, 276
- меченая 299, 310, 311
- митохондриальная 391, 438
- молекулярный вес 296, 312, 359
- нативная 288, 296, 315, 316, 409, 410, 465, 507
- нуклеозидный и нуклеотидный концы 294—296, 294
- нуклеотидный состав в разных организмах 281, 465, 466
- обратимость синтеза 298
- одонитчатая 285, 288, 290, 408, 410, 439, 466
- организация in vivo 280—286, 289, 290
- остов 273, 276, 282, 289
- плавление 315
- полимеразы 294—296, 302—306, 462, 464, 470
- полимеры 273, 276, 289, 298
- первичная структура 280, 281
- поглощение ультрафиолетовых лучей 287
- разделение нитей 285, 286, 296, 315, 317, 409
- разрыв и обмен 314, 314, 315
- рекомбинация нитей in vitro 315—317
- ренатурация 288, 315, 316
- рентгенограмма 282, 282
- репликация и разделение цепей 285, 286, 287, 288, 289
- репликация in vivo 286—289
- репликация in vitro 292—304
- синтез de novo 301, 302, 315
- синтезы экстенсивный и ограниченный 294—29
- скручивание 282
- содержание в геномах 280
- содержание в колициногенных факторах 374
- «сохраняющаяся» и «несохраняющаяся» 504, 505, 508
- спектр поглощения 315
- спирализация 506
- тимуса теленка 289, 296, 300, 316
- тяжелая 286—288, 287
- увеличение цепи 294, 295, 295, 298
- Уотсона — Крика модель 282, 282, 284, 285, 289
- урацил 465, 466
- ферменты для синтеза предшественников 463—465, 463
- химический состав 269—275
- хромосом слюнных желез личинки дрозофилы 289
- цитоплазматическая 505
- эволюция 521—525
- эритроцитов 507

- ядерная 276, 289
- ДНКазы (дезоксирибонуклеаза) 275, 294, 295, 299, 344, 453, 454
- доверительный интервал 532, 537
- доза 209
- мощность 197, 198
- пороговая 201
- удваивающая 239, 498
- дозовая компенсация 495—500
- доминантность 42, 55, 56, 81, 209, 217, 219
- донор 310, 312, 324, 331, 336
- дрейф генетический случайный 218, 258, 259
- дрожжи 281, 391, 466
- Drosophila*
- библиография 37
- глаз сложный 488
- дозовая компенсация 498—500
- и внеядерные гены 383, 384
- искажение расщепления 400, 401
- слюнные железы личинок 269
- хромосомы в природе 252—255, 253, 254
- эффект положения 485—493
- *melanogaster* 31, 31, 32, 492
- — кроссоверная карта X-хромосомы 142
- — крылья 57, 67
- — моносомная и трисомная 167, 169
- — обнаружение мутаций 210—213
- — определение пола 110—115
- — сцепление с полом 97—105
- — триплоидная 113, 166
- — хромосомная карта 199
- — хромосомы 102
- — хромосомы слюнных желез 167
- *persimilis* 262
- *pseudoobscura* 226, 231, 231, 258, 258, 262, 500
- дупликация 183—187, 184, 197, 396, 432, 432, 493

- Енольная форма 408
- естественный отбор 260—262
- Escherichia coli* (кишечная палочка) 293, 294, 306—309, 306, 404, 466, 471, 525
- генетическая карта 338, 339
- карта сцепления 363
- Lac область 470—472
- состав оснований в ДНК 281

- Железа слюнная личинки дрозофилы 269
- жизненные циклы 30—35
- жизнеспособность (см. также мутант) 76, 77, 77, 227
- жужжальца 491

- Закон экономии (см. Оккама правило)
- зародыш 33, 33
- Zea mays* (кукуруза) 32, 33, 33, 224, 477—484, 478
- активатор (Ac) и диссоциатор (Ds) 398—400, 399
- библиография 37
- генетическая карта 154
- гетерозис 225, 227
- зерно 32, 33, 33, 399
- зигонема 24
- зигота 13, 327, 385, 498, 512
- зиготная индукция 348

Идио
мейн
излуч
— п
изоал
изоте
имаг
имаг
имин
имму
инакт
инбри
инвер
227
ингиб
индол
индук
индук
472
инози
311
иноку
инсул
интегр
337,
интерс
интерф
интерф
интерф
интрод
инфекц
информ
инъекц
иониза
ионы м
искаже
Каппа-
капуст
карбокс
кариосо
кариоти
кариоти
карлико
каротин
карты х
— генет
— — E
— — ф
— — ф
— един
— кросс
150, 1
каталаза
катализ
катализа
квадрати
548
квант 20
кетог-фор
киназы 4
кинетопл
кинетосо
кинетох
кислород
— и пере
Клайнфел
клетка 13
— антип
— гибрид
— донор

Идиотия юношеская амавротическая семейная 220
 излучения 193
 — и мутации 193—201, 194, 195, 198, 199
 изоаллели 66, 67, 205, 397
 изогенные линии 77
 имаго 32
 имагинальный диск 90
 имино-форма 408
 иммунитет 373, 374
 инактивация 498
 инбридинг 221—223, 227, 228, 401
 инверсии 180, 181—183, 188, 196, 226, 227, 258, 259, 400, 407, 486
 ингибирование 468, 470
 индол 345, 423
 индуктор 471
 индукция 92, 93, 348, 349, 373, 471, 472
 инозиновой кислоты пирофосфорилаза 344
 инокуляция 402
 инсулин 12, 235
 интеграция 313—315, 324, 327, 329, 336, 337, 340, 414
 интерсекс 111, 112
 интерфаза 16, 16, 18, 25, 26, 417, 495
 интерференция 146
 интерферон 468
 интрогрессия 265, 266
 инфекционный фактор 331, 332
 информационная РНК, мРНК (см. РНК)
 инъекция 503
 ионизация 193—195
 ионы магния 292—294, 462
 искажение расщепления 483
 Каппа-частицы 387—389, 467, 470
 капуста 264, 265
 карбоксильная группа 424
 кариосомы 495
 кариотип дрозофилы 102, 231, 252, 253
 кариотип человека 171, 172
 карликовость 90, 90, 91, 219
 каротины 522
 карты хромосомные 199
 — генетические
 — — *E. coli* 337, 338, 339, 363
 — — фага лямбда 363
 — — фага Т4 356, 360, 361
 — единица длины 141
 — кроссоверные, или сцепления 142, 149, 150, 154, 157
 каталаза 524
 катализ 522
 катализатор 524
 квадратичное отклонение 70, 532, 540, 548
 квант 207
 кето-форма 270, 271
 киназы 464
 кинетопласт 392, 393
 кинетосома 392, 393, 524
 кинетохор (центромера) 14, 16
 кислород 270, 271, 420, 521, 522, 525
 — и перестройки 196
 Клайнфельтера синдром 116, 117
 клетка 13, 14, 15, 293, 384
 — антипод 33, 33
 — гибридизация соматических 514
 — донор 310, 312, 324, 331, 336

— компетентность 312
 — мембрана 14, 15
 — организация 517
 — плазматические 515
 — реципиент 310, 312, 324, 331, 336
 клон 307—309, 308, 320, 326, 327, 329, 422, 514, 516
 код генетический 449—461, 525
 — вырожденный 449, 452, 455, 458
 — двусмысленный 449, 458
 — колинеарный 459
 — неперекрывающийся 450
 — примитивный 523
 — триплетный 455
 — универсальный 458, 459
 кодон 449, 451, 456—458, 523
 — бессмысленный 452
 — идентификация 453—459
 — осмысленный 452, 459
 колинеарность 458
 колициногенные факторы 373—375
 коллаген 514
 коллохоры 200, 204, 396
 колхицин 263
 компетентность 88
 комплементация 358
 конидии 34, 34
 конкордантность 84, 85, 85
 конъюгация 204, 327, 329, 344, 368, 372, 487
 — у *E. coli* 324—329, 326, 333, 336
 — у *Paramecium* 388, 388, 389, 467, 516, 517
 кополимер 301, 412
 кортекс 516, 517
 корь 86, 402, 514
 космическая хеомэволюция 525, 526
Coturnix (перепел) 95
 «коэффициента интеллектуальности» метод 86
 коэффициент отбора 219
 коэффициент совпадения 84, 85, 85, 145, 147
 краб 301
 крапчатая бляшка 357
 красные кровяные тельца 64, 79, 79, 428
 кристы 391
 кролик 11, 12, 65, 74, 78
 кроссбридинг 260, 261
 кроссинговер (см. также хиазмы) 127, 130, 135, 138, 181, 290, 485
 — внутри цистрона 492
 — и сцепление 125—136
 кроссовер 127—139, 135, 146, 147, 396, 489
 — единица длины 134, 135, 137
 — частота 128, 134—136, 142, 143, 148, 149, 157
 крысы 498, 514, 515
 ксантин 409
 cubitus interreptus (разрыв кубитальной жилки) 67, 67
 куколка 32, 32
 культура ткани 174, 307, 308, 514
 культуральная полноценная среда 90, 325
 curled wing (закрученные крылья) 57
 куры 100, 101, 101
 — коротконогость 87—90, 88, 89

Лар-период 301, 303, 304
 Лас сегмент 369, 470—472
 лактат 404
 лактоза 471, 472
 лейкопласты 384, 386
 лейцин 325
 лейкоциты 402
 лептонема 24, 27
 летали 77, 77, 212, 231, 245, 246, 511
 — сбалансированные 251
 летальный эквивалент 233
 лизин 428, 507
 лизис 344, 348, 354, 355, 389, 453
 лизоген 344
 лизогения 348, 349
 лизосома 15
 лилия 24, 25, 26, 513
 липиды 377
 литический цикл 355
 личинка 32, 32
 локус 131, 254, 313, 326, 334, 345, 348,
 384, 422, 481, 482, 489, 496, 497
 лошадь 425
 лук 17, 506
 лучи Гренца 195
 Lir («низкая частота рекомбинации») 332
 лямбда-частицы 387

 Мадия 262
 макронуклеус (мегануклеус) 387, 516
 малярия 225, 226
 марганец 407
 маркеры селектируемые 327
 маркеры неселектируемые 328, 328
 Марс 216, 526, 527
 матрикс 198, 505
 матрица 297, 298, 300, 521
 «Маху», метод 212, 213
 мегаспоры (мегаспороциты) 32
 межвидовая гибридизация 263, 264, 264,
 265
 межнуклеотидное расстояние 444
 мейоз 23—25, 422, 495, 524
 — анфаза I, II 25—28, 25, 27
 — второе деление 26
 — диффузная стадия (стадия роста) 25
 — диакинез 25, 26, 27
 — интерфаза I 25, 26
 — метафаза I, II, 25, 26, 27, 28
 — модификации 397
 — и пары генов 53—55, 54, 55
 — профазы I, II 24, 25, 26, 28
 — — диплонема 24, 25, 26, 27
 — — зигонема 24
 — — лептонема 24, 27
 — — пахинема 24, 25, 27
 — — синапсис 24, 29
 — телофаза I, II 25, 26, 28
 — у нейроспоры 133, 133, 134
 — у энотеры 247—249, 248, 249, 250
 мейотический дрейф 401
Melandrium 124
 меланин 419, 420
Melanoplus (кузнечик) 504
 мембрана 14, 15, 391
 мера интеллектуальности 86, 87
 мерогенота 334, 371, 372
 мерозигота 334, 349, 370
 меромиксис 334
 метаболизм 201, 269, 276, 397, 405, 414,
 417, 419, 420, 516

— врожденные ошибки 418—420
 метагоны 467
 метаморфоз 32
 метан 521
 метафаза 14, 16, 18, 25, 26, 27, 28
 метиленовый зеленый 275
 метионин 343, 442
 миграции 218, 258
Mycobacterium 281, 300, 466
 микроделеции 205, 485
 микродупликации 205, 485
 микронуклеус 387—389, 516
 микроспектрофотометрический метод 275
 микроспоры (микроспороциты) 32, 513
 миксина 432
 минога 432
 миоглобин 431, 432, 432
 митоз 13—18, 16, 17, 396, 495, 513, 514,
 524
 — действие облучения 199
 — регуляция 513
 митоминин С 409
 митохондрии 15, 391, 391, 393, 516, 524
 мицелий 34, 34, 514
 млекопитающие 495—498
 множественный эффект (см. плейотро-
 пизм)
 модулятор 478
 мозаичность 385—387, 385, 477—481,
 478, 479, 498
 — функциональная 496, 497
 — эритроцитов 514
 моллюск 392
 моль 101
 монада 24, 26, 30
 моновалент 24, 26, 28
 моногибрид 52, 429
 мономеры 293, 440
 мононуклеотиды 277, 278
 моносомик (гаплосомик) 167, 169—173
 морской еж 165, 281
 мостик 178, 179
 мультигенные (полигенные) признаки
 69—72
 мутабельность 206, 396
 мутагены 206, 310, 320, 412, 414
 — и антимутагены 404, 405
 — физические 411
 — химические 404, 407, 409, 411
 мутагенез 290, 409
 мутагенный эффект 405
 мутант (см. также ген, мутации) 13, 57,
 320, 358, 406, 450, 478
 — бактериальный 309, 424
 — внехромосомный 391
 — и популяции 216
 — конститутивный 472
 — обнаружение 162—164, 210—213
 — супрессор 453
 — устойчивость к антибиотикам 323
 — чувствительность к температуре 511
 мутационные «горячие участки» 406, 414
 мутационный спектр 206, 405, 406
 мутация (см. также мутант) 12, 18, 77,
 413—415, 486, 488, 490
 — «видимые» 212
 — в природных популяциях 231, 232
 — гемизиготные 210—213
 — генетический контроль 396—403
 — генные 204
 — герминальные 238—241

- индуцированные 205—207, 210
- и тепло 193
- и ультрафиолетовые лучи 409
- и эволюция 236, 237
- летальные 77, 211, 213, 231, 232
- молекулярные основы 404—415
- обнаружение 162
- обратные 406, 481
- период существования в популяции 242
- плеiotропное действие 417
- полулетаи 77, 231
- соматические 237, 238
- спектр 206
- спонтанные 205—207, 210, 323, 414
- стерильность 231
- субвитаи 77, 231, 232
- субнуклеотидные 407—413
- точечные 203—215, 236, 241, 397, 398, 409, 422, 423, 450
- у бактерий 307, 320—324, 397
- фенотипические эффекты точечных 208—213
- частота 206, 207, 212, 235, 238, 239, 324, 405, 414
- экспериментальное определение 413, 414
- мышечная дистрофия 496
- мышь 76, 77, 90, 91, 92, 116, 117, 497, 498, 515
 - группы сцепления 149, 150
 - культура ткани 513, 514
 - митохондрии сердца 391
 - мутации 151—155
 - эффект положения 497

Нейроны 470, 515

Neurospora crassa (хлебная плесень) 34, 34, 35, 309, 391, 421—423, 433

- библиография 37
- кроссоверная карта 157
- митохондрии 391, 391

неоморфы 209, 210

Nepeta (кошачья мята) 387

нехватки, или делеции (см. хромосома)

Nicotiana (табак) 67, 68

нитей рекомбинация *in vitro* 315—317

нормальная кривая 546

нуклеиновая кислота (см. также ДНК, РНК) 277, 278, 402, 407, 414, 465, 522, 524, 527

нуклеогистон 506

нуклеозиды 277, 278, 462, 521

- фосфаткиназа 464

нуклеоплазма 13, 504, 506

нуклеопротейд 278, 289, 523, 527

нуклеотиды 282, 283, 289, 350, 449—452

- монофосфаткиназа 463

нулевая гипотеза 536

нулосомик 172

Ньюкасла болезнь 377

Обмены 29, 44, 260, 261

обратной связи механизм 470

обучение и РНК 515

овариолы 31

однодомное растение 32, 120

один ген — один первичный эффект 421, 424, 433

один ген — один полипептид 424—426, 434

один ген — один фермент 421, 424, 433
Oenothera (ослиник) 164, 244—252, 244, 245

озон 522

Оккама правило (закон экономии) 40, 205

околоплодник 33, 33

оксидаза 419, 420

оксиметилаза 464, 511

олигодезоксириботид 301

омматидии (фасетки) 486, 487

оогенез 32, 397

оогонии 31

оопиты 31, 32, 498, 504—508

оперон 470—475

оплодотворение 13, 32, 33, 51

- двойное 33

- само или перекрестное 42, 43, 222

- случайное 51

ортофосфат 464

основания органические 269—272, 280—290

- замена ротационная 412, 414

- изменения в новых генах 412, 413

- изменения в старых генах 408—412

- метилирование 442

- пары 283, 283, 409, 409

- содержание в разных организмах 280, 281

- состав в ДНК 465, 466

отбор 218, 396

- генотипов 219

- коэффициент 219

- против мутаций 219, 220

«отпечатки пальцев» 426, 427, 430

отпечатков метод 321—326, 322, 323, 326

ошибки включения и репликации 412

Пальцы 80, 81

панмиксис 221

папоротник 400

парагидроксилаза 420

паракристаллическая структура 283

Paracetamol 387—390, 388, 389, 467, 516

параметр 538

парамутирование 482—484

паранемное и плектонемное скручивание 282

парасексуальность 514

парацентрический разрыв 180, 181

паркинсонизм 515

партеогенез 166

пенетрантность и экспрессивность 80—82

Penicillium 514

пентозы 271, 273, 277, 278

пептидная связь 424

перекрест 131, 132, 486, 489, 490

перекрывание фенотипов 39

переменные дискретные 531—535

переменные недискретные 531

переменные непрерывные 545—550

перепончатокрылые 120

перикарп 477

период полураспада 240

периферический разрыв 180, 181

пермеазы 471, 472

пестик 32, 33, 67

пигмент 398, 399, 420, 478, 482, 522

пиноцитоз 312

пивоцитозный пузырек 15
 пиримидины 269—271, 270, 271, 277, 297, 408, 465
 пирофосфат 292, 294, 298, 442, 464
 питательная среда 421
 питающие клетки 31
 плазмобласты 514, 515
 пластиды 384—387
 плейотропизм 77—79, 78, 93, 245, 420
 плодовое тело 34, 35, 133
 плоидность 164, 165, 174, 396, 397, 495, 496
 плотности градиент 287, 287
 плюс минус критерий 541
Pneumococcus 311
 пол
 — аномальные типы 112
 — индекс 112, 113
 — мозаичность 114, 114, 115
 — определение 110—124
 — соотношение у человека 118, 119
 — сцепленные с полом гены 97—102
 — у бактерий 331—341
 — у хламидомонады 390, 391
 — фактор 370—372
 — хроматин 495—497
 — хромосомы 97—109
 поли- (A + U) 303
 поли- (dA + T) 303
 полиадениловая кислота 523
 полидактилия 79—81, 80
 полидезоксириботиды (полидезоксирибонуклеотиды) 273, 276
 поликариозитоз 514
 полимер 273, 301, 523
 полинемия 167, 166, 168, 174
 — степень 276
 полинуклеотиды 273, 276, 278, 466, 523, 527
 — фосфорилаза 445, 454
 полиомиелит 85, 85, 377, 467
 полипептиды 282, 424, 425, 442, 522
 — аминок (NH₂-) конец 444
 — и действие гена 417—434
 — карбоксильный конец 444
 — синтез и РНК 436—446
 полиплоидия 164, 174, 414
 полирибонуклеотид 454, 455
 полириботид 277, 278
 полирибосомы (полисомы, или эргосомы) 444
 полисомик 171
 полиспермия 505
 полиуридиловая кислота 523
 полифосфаты 522
 полового процесса значение 121
 половой числовой индекс 112, 113
 положения, эффект 398
 — у дрозофилы 485—494
 полосковидные глаза 210, 486
 полусибсы 222, 228
 полутранслокация 185, 186, 253
 полярные ядра 32, 33
 популяций генетика 216—228, 231—242
 — метод 44
 порфирины 522
Potentilla (лапчатка) 259
 потенциал размножения (биологическая приспособленность, или адаптивная ценность) 208, 210, 218

початки 32, 478
 признаки мультигенные 69—73
 приспособленность биологическая (см. потенциал размножения)
 провирус 468
 пролин 455
 промотор 372
 проростки кукурузы 385, 386
 протамины 268, 269, 289, 507, 508
 протеиноиды 522
Proteus 350
 протонное излучение 522
 прототрофы 312, 326, 344, 422, 473
 профаг 468
 профазы 14, 17, 18, 24, 25, 26, 28
 профлавин 407
Pseudomonas 350, 446
 пурины 270—272, 270, 277, 281, 297, 408, 409, 466
 — 2-амино 272
 — 6-диметиламино 272
 — 6-метиламино 272
 — рибозиды как антимуагены 404, 405
 пуромидин 437
 пуфы 503, 504, 506, 508
 пшевица 168
 пыльца 68, 131, 385
 пыльцевое зерно 32, 68

 Равелаза, анравелаза 317
 рад 195, 239
 радиация 199, 241
 радикал 270, 526
 радиоавтография 503, 505
 размножение бесполое 13
 размножение половое 13
 рак 281, 396, 515
Rana (лягушка) 165, 512
 распространяющийся эффект 485
 растворимая РНК (см. РНК транспортная)
 расщепление 28—30, 50, 169, 414
 — аллелей 38—48
 — независимое 30, 50, 51, 51
 расы 257—260
 — аллопатрические 259, 260, 266
 — и происхождение видов 257—267
 — симпатрические 259, 260, 266
 r II область 357—362, 358, 360, 361, 449—453, 492
 реверсии 474, 481, 487
 регрессия 71, 72
 редька 264, 265
 резус фактор (Rh-фактор) 65
 рекомбинанты 128—131, 147, 326, 334, 345, 400
 ренатурация 315
 рентген 195, 239
 рентгеновые лучи 193, 281, 282, 320, 522
 — и мутации 193—198, 194, 195
 рентгенограмма 282
 репликативная форма 380, 439
 репликация (см. также ДНК, РНК) 16, 18, 379, 464, 466
 репрессор 471, 472
 репродуктивная изоляция 260, 261, 262
 репродуктивный потенциал 219, 235, 236, 261
 ретикулоцит 454, 458
 ретинобластома 219, 234
 рецессивность 42

рибоза Д
 — 2'-дез
 273
 рибозиды
 466
 — как а
 рибонукл
 рибонукл
 рибонукл
 рибонукл
 рибосомн
 рибосомы
 512, 51
 — поли
 риботиды
 риккетси
 РНК 277,
 — вируса
 380
 — в пуфа
 — вторич
 — двунит
 — и анти
 — и генет
 — и коди
 — информ
 443—44
 — и поли
 — как ге
 — как ма
 — компе
 — метагон
 — метили
 — молеку
 — неметил
 — одност
 — первич
 — полимер
 — — зави
 — — зави
 — последо
 442, 452
 — при диф
 516
 — регуля
 — реплика
 — реплика
 — рибосом
 — синтез
 516
 — синтетаз
 — транспо
 или ада
 — химичес
 — ядерная
 РНКазы (р
 445
 рогаый ско
 P₁, P₂ 39,
 родословны
 — анализ
 — обознач
 роста стади

 Сайт 204, 21
Salmonella
 473
 самореплика
 самостериль
 сбалансиров
 245, 246

рибоза Д 271, 273, 277, 407
 — 2'-дезоксид-Д-рибоза (дезоксидрибоза) 273
 рибозиды (рибонуклеозиды) 277, 380, 407, 466
 — как антимутагены 404, 405
 рибонуклеазы 278, 467
 рибонуклеозиды 463, 467
 рибонуклеопротеиды 277, 437, 440
 рибонуклеопротеин 377
 рибосомная РНК (см. РНК)
 рибосомы 436—439, 437, 442, 443, 474, 512, 514
 — поли 444
 риботиды (рибонуклеотиды) 277, 449
 риккетсии 389
 РНК 277, 523, 524
 — вируса табачной мозаики (ВТМ) 378—380
 — в пуфах 503
 — вторичная структура 379
 — двунитчатая 380, 381
 — и антитела 514, 515
 — и генетическая рекомбинация 377
 — и кодирование аминокислот 449—459
 — информационная, мРНК 438—440, 443—445, 443, 451—454, 475, 513
 — и полипептидный синтез 436—446
 — как генетический материал 377—381
 — как матрица для синтеза ДНК 303
 — комплементарная 380, 440, 470, 475, 525
 — метагонов 468, 524
 — метилированная 442
 — молекулярный вес 437, 438
 — неметилированная 442
 — одонитчатая 282, 380, 381
 — первичная структура 379
 — полимеразы 439, 470, 516
 — — зависящая от ДНК 440
 — — зависящая от РНК 380
 — последовательность нуклеотидов 441, 442, 452, 454
 — при дифференцировке и обучении 515, 516
 — регуляция синтеза генов 466, 467
 — репликаза 380
 — репликация 380, 381, 466, 468
 — рибосомная 437, 440, 441, 467
 — синтез 438—441, 445, 467, 495, 508, 516
 — синтетаза 380, 466
 — транспортная, тРНК (растворимая, или адаптерная) 441, 441, 442, 443, 507
 — химический состав 277, 278
 — ядерная 439, 515
 РНКазы (рибонуклеазы) 379, 439, 443, 445
 рогатый скот 62, 262
 Р₁, Р₂ 39, 40
 родословные 45, 80, 105, 109, 221, 417
 — анализ 44
 — обозначения 44, 44
 роста стадия 25
 Сайт 204, 213, 405, 413, 415
Salmonella 343—351, 347, 348, 372, 402, 473
 саморепликация 346
 самостерильность 67—69
 сбалансированная летальная система 245, 246

сбалансированный полиморфизм фено-
 типов 234
 сверхсамки 112, 112, 113
 сверхсамцы 112, 112, 113
 сегреганты 327
 седиментации единицы 437
 сексдукция 371
 селективируемые маркеры 327
 семяприемник 31
 семя 385
 сера радиоактивная 354
 серин 289, 423, 455
 серповидноклеточная анемия 78, 79, 79, 224, 225, 428
Serratia 340
 снамский кот 12
 сиблинговые виды 262
 сибсы 82, 222, 228
Shigella 372
 сигма-частицы 384, 389
 синапсис 24, 130, 167, 204, 251, 312, 313, 396, 499
 синглет 516
 синергида 33
 система обратной связи 471
 скрещивание 39, 52, 76, 77
 — анализирующее 52, 53
 — ассортативное 221
 — возвратное 53
 — двойное 225, 227
 — дигибридов 71, 71
 — межвидовое 503
 — одиночное 227
 — неслучайное 220—223
 — реципрокное 39, 129, 129, 131
 с-мутанты 363, 363
Solanum 263
 соматические клетки 23
 — гибридизация 514
 сомиты 91
 сополимеры 522
Sordaria finicola 161
Spartina (болотная трава) 264
 сперма 31, 281, 289, 301, 384
 сперматека 31
 сперматиды 31
 сперматогенез 31
 сперматогонии 31
 сперматоциты 31
 спермии (сперматозоиды) 13, 32, 197, 324, 406, 487, 505
 — у человека 118, 119
 спермиогенез 118
 спирохета 119, 384, 389
 спорифит 32, 33
 споры 133, 134, 135, 422
 среднее арифметическое 70
 — выборочное 547
 средняя ошибка 547
Staphylococcus 350
 стерильность 231
 — перекрестная 68, 69
 — само 68, 69
 стероиды 516, 517
 стерол 516
 стрептомицин 312, 313, 320, 321, 321, 323, 332, 390
 стронций-90, 240, 241
 субвители 231, 232
 сульфаниламид 406
 суперрегуляторные механизмы 483, 484

суперрепрессор 471, 473
суперсексы 112, 112
супрессия 499, 500
супрессор 397, 450, 473
Sciara (комар) 504, 505

Талассемия 46
талидомит 12
т (тау)-критерий 548
таутомерия 408, 408, 409
теломеры 177, 200, 203, 524
телофаза 16, 17, 17, 25, 26, 28
тельце Барра (хроматин половой) 495—497, 500
температура и мутации 206
теофиллин как мутаген 404
тепло 193, 522
Тернера синдром 116
тестостерон 516
тетрада 24, 26, 490
тетрамеры 427, 429, 430, 515
тетраплоиды 113, 164, 165, 165
тиамин (витамин B₁) 325, 421, 422
тимидилатсинтетаза 463, 512
тимидиловая кислота 273
тимидин 274
— киназа 513, 517
тимин (2,6-диокси-5-метилпиримидин) 270, 271, 271, 280—283, 283, 406, 465
— димеры 409, 410
— как мутаген 405
тиоурацил 466
тирозин 418, 419, 420
тироксин 516
t-критерий 539, 548
транзигция 411—413, 411
трансверсия 411—413, 411
трансдукция 343—351, 348, 371, 372, 389
— абортивная 346, 349, 470
— механизм 465
— неспецифическая (общая) 345, 349, 350
— полная 346
— специфическая (ограниченная) 348—350
— сцепленная (котрансдукция) 345, 346
транскрипция 438, 452, 467, 468, 500, 523
— единица 473, 475
— и дифференцировка 512, 513
транслокация реципрокная 184, 185, 199, 249—253, 251, 402, 492, 497
трансляция 438, 452, 523, 525
трансмиссионная генетика 38, 49, 93
трансплантация закладки глаза 434
транспозиция 187, 190
транс-положение 362, 362, 489, 489
транспортная РНК, тРНК (см. РНК)
трансформация генетическая 309—318, 324, 326, 345, 414, 514
— вероятность 312
— внутривидовая 312
— и интеграция 313—315
— и мутация 311
— и синапсис 312—314
— как механизм генетической рекомбинации 312
— межвидовая 312
— условия 312
— частота 311, 313, 326

треки ионизации 193, 196, 200
треонин 325, 343
тривалент 169
трипаносомы 393
триплеты 449, 451, 455, 458
триплоид 113, 113, 166
трипсин 353, 427, 428
триптофан 345, 404, 433
— пирролаза 515
— синтетаза 423, 424
трисомии 169, 171—173
третий 505
тригон 504
туберкулез 85, 85, 280
тюльпан 263

Углевод 407
углекислый газ 383, 384, 521
углерод-14 240, 268, 292, 293, 525
уксусный альдегид 523
улитка 120, 505, 513, 517
ультразвук 522
ультрафиолетовые лучи (УФ) 193, 277, 287, 409, 522
— и мутации 206, 207
— и индукция 348, 363, 410
ультрацентрифугирование 287, 288, 465, 506
Уоринга смеситель 333
Уотсона — Крика модель 282, 282, 284, 285, 289
урацил (2,6-оксипиримидин) 271, 277, 297, 409, 503
— в ДНК 465, 466
— димеры 412
— 5-бром 297, 406, 466
— 5-фтор 298, 453, 466
— таутомеры 408
уридин 405
устойчивость к колицинам 373

Фаг (см. бактериофаг)
фагоцитоз 312
фактор передачи устойчивости (RTF) 372, 373, 375
факторы роста 433
фамильное древо 44
фасетки глаз 486, 487
Фельгена метод 16, 275
фенилаланин 325, 418, 419, 420, 454
фенилкетонурия 221, 221, 223, 429
фенилпировиноградная кислота 420, 420
феногенетика 87, 93
фенокопия 12, 332
феол 378
фенотип 10—13, 38, 52, 163, 208, 393, 488
— соотношения 41, 42, 55—59
фенотипическая изменчивость 11
фенотипическое различие 11, 12, 38, 258
фенотипическое сходство 11, 12, 38
фенотипической вариации амплитуда (норма реакции генотипа) 12
фенотипический эффект 11, 383, 398, 401, 421, 481, 485, 511
ферменты и гены 421—424, 470, 471
фертильность 171
F₁, F₂ 39—42
фибробласты 194, 505
F⁻ и F⁺-клетки 331—341, 368—372, 471

фокомелия 88

формильные группировки 523

фосфаты 273, 275, 277, 295, 299, 407, 463
— — пиро- и орто- 464

фосфодиэстераза змеиного яда 380

фосфодиэстераза селезенки 294, 295, 299

фотовосстановление 410, 411

фотопродукт ультрафиолетовых лучей 409

фосфор-32 (P^{32}) как мутаген 408

F-фактор 331—341, 368—375

Habrobracon juglandis (оса) 120

Харди — Вейнберга правило равнове-
сия 217, 228—230

Xg-локус 149

хемосинтез 522

Xenopus laevis (жаба) 440

хиазмы 24—26, 26, 29, 30, 44, 130—136,
131, 134, 135, 143—147, 143, 145, 157,
422 (см. также кроссинговер)

хиазм интерференция 145, 147

χ (хи)-квадрат 537, 538, 539, 542—544

хемотрипсин 427

Chironomus (комар) 503

Chlamydomonas reinhardi 289, 390, 391

хлорамфеникол 323

хлоропласты 384—386, 437, 524

хлорофилл 384—387, 524, 526

хондродистрофия (ахондроплазия) 88

хроматида 14, 16, 17, 18, 24, 145, 157,
179, 180, 195, 289, 290

хроматин 16, 507, 508

— половой (тельце Барра) 495—497, 500

хроматография 427, 463, 506

хроматофорные группы 409

хромомеры 506

хромосома 14—18, 16, 17

— анеуплоидность 169, 180

— анеусомия 169—174, 173

— анеуцентрическая 182

— ацентрическая 178

— бактерий 335, 337, 466

— баланс 114, 169—173

— гетероморфная 101

— гетерохроматиновые участки 168, 199,
201, 204, 462

— гигантские 19, 506

— гипер- и гипопикнотические 495

— гомологичные 18, 19, 30, 263, 396, 493,
499, 524

— движение 14, 247, 248

— деспирализованные 498, 508

— диминуция 505

— дицентрическая 178

— дочерные 524

— дублиеты 449, 458, 492, 516

— дупликация 183, 184, 184, 332 (см. так-
же дупликация)

— изменение числа 162—174

— изохромосома 178

— как генетический материал 18, 19,
105—107

— классификация концов 252

— количество 18, 19

— кольцевая 181, 203, 336, 466

— конденсация 498

— кроссоверные 489

— линейные 336, 336

— «ламповые щетки» 505, 506, 508

— матрикс 505

— моноцентрическая 403

— мостик 178, 179

— негомологичные 18, 30, 480

— нерасхождение 103, 103, 104, 169,
174, 397

— нехватки, или делеции 178, 180, 181,
183, 184, 188, 190, 196, 254, 358, 396,
407, 451, 452

— объем 196

— перестройки 196—201, 244—255, 244,
245, 248, 249, 250

— петли 188, 505, 506, 508

— плечо 18, 249, 250, 253, 400, 490,
500

— полинемные 167, 167, 168, 289, 397,
403, 499, 503, 506

— полицентрические 203, 403

— половые 97—107

— пуфы 503, 504, 506, 508

— разрыв 179, 179, 180, 180, 193—197,
195, 200, 334, 335, 398, 402, 485

— расхождение 29

— расщепление 28—30

— редукция числа 19, 24

— рекомбинация 29, 42, 49

— репликация 16—18, 40, 42, 167, 525

— слюнных желез 167, 168, 188, 189,
397, 486, 487, 492, 493, 499, 506

— спирализация 495, 500, 509, 525

— структурные изменения 177—190

— — вызванные облучением 193—201

— сцепленные X 401, 490, 490

— утрата 169, 170, 173 (см. также не-
расхождение)

— форма 16, 247, 248, 249, 254

— человека 18, 172, 173, 194

— число 18, 113

— элиминирование 505

— эталонные 251

— эупикнотические 495

— эутеломерные 183

— эухроматиновые участки 168, 199,
201, 204

— эуцентрические 182

хромоцентр 168

Hfr-клетки 332—337, 335, 336

Цветовая слепота 102, 129, 149

цезий-137, 240, 392, 393

цезий хлористый 287

центриоль 392, 524

центромера (кинетохор) 14, 16, 29, 30,
249, 392, 400, 422, 486, 490, 524

центросома 15, 392, 393

пис-положение 362, 489, 489, 490

цистидия 405

цистин 325

пис-транс тест 362, 489

цистрон 362, 362, 413, 449, 450, 492

цитогенетика 30, 187, 188, 255

цитозин (6-амино-2-оксипиримидин) 270,
271, 271, 277, 280—288, 409, 453,
464

— 5-бром 297

— 5-гидроксиметил 271, 271

— 5-метил 271, 271, 297

— 5-фтор 298

цитоплазма 13, 15, 508

цитоплазматические факторы 512

цитоплазматический мостик 343, 467

цитосома 13

цитохимия 275

Человек

- анаусомия 171—174
- близнецы 82—87, 83, 85
- генетика 44—46, 44, 45, 115—119, 232—241
- и радиация 194, 237—241, 238
- карта X-хромосомы 149
- нуклеотидный состав ДНК 281
- содержание ДНК 280
- хромосомы 18, 172, 173, 194, 496
- чистая линия 10, 10, 11, 38, 244

Шерстистые волосы (wolly) 45

пизофрения 86

штаммы 309, 320, 325, 335, 336, 348, 379, 453, 463

штриховой посев клонов 308, 321

Щавелево-уксусная кислота 523

Эволюция 242, 281, 396

- биологическая 218
- генетического материала 520—528
- ДНК и РНК 526, 527
- и дупликации 431, 432
- молекулярная гемоглобина 431—434
- предгенетическая 525
- постгенетическая 525
- структурная 527
- химическая 521—527
- экдизон и образование пуфов 503
- экзогенота 346, 348, 369
- экзонуклеаза 380
- эклипсная фаза 511
- эксонъюгант 467, 516
- экспрессивность и пенетрантность 82, 83
- электромагнитные волны 193
- электроны быстрые и мутации 193, 197, 198

электрофорез 506

- элиминация 186, 397
- эмбрион 87—91, 89, 92
- эмбриональное развитие 32
- эндолизины 355
- эндоплазматический ретикулум 15
- эндорепликация 166
- эндосимбионты 467
- эндосперм 33, 33, 398, 498
- энергия 193, 195, 292
- энотера (см. *Oenothera*)
- энцефалит 377
- эписомы 331—342, 350, 351, 384, 392, 402, 470, 513
- бактерий 368—375
- и умеренные фаги 350
- как мутагены 401—403
- эпистаж 58, 59, 81
- эритроциты 64, 65, 79, 496
- ДНК в мембранах 516
- эры химической эволюции 521—525
- эстрогены 516
- эуплоидия 164, 174, 237, 238, 396, 496
- эухроматин 401, 486, 493
- эякуляция 31, 118

Яблоня 9, 263

- ядерная мембрана 14, 15, 392, 495
- ядерные зоны у *E. coli* 306
- ядро 13, 15, 26, 32, 268, 514
- ядрышко 14, 15, 504, 506
- ядрышковый организатор 18, 440, 441, 504
- яйцеклетка 13, 384, 406, 505, 512
- яйцо 32, 32
- янтарная кислота 423

- Abelson P. H. 527
- Adams J. N. 633
- Adelberg E. A. (А) 330, 334—336, 347, 376, 416, 435, 470
- Adler J. 601
- Akinrimisi E. O. 31
- Alexander P. (Алек) 476, 514
- Allen J. M. 476, 514
- Allen M. K. 315, 316
- Allfrey V. G. (Олфр) 505, 507—510, 651
- Allison A. C. 230
- Altenburg (Альтенбу) 476, 514
- Amano T. (Аmano) 476, 514
- Ames B. N. 476, 514
- Anderson T. F. 333, 334
- Anfinsen C. B. (Анф) 476, 514
- Arber W. 349, 352, 353
- Arnott C. 579, 582, 583
- Arnstein H. R. V. 601
- Asano K. 652
- Astbury W. T. (Астр) 663, 674
- Astrachan L. (Астр) 663, 674
- Attardi G. 651, 674
- Auerbach C. (Ауэрба) 574
- August J. T. 447
- Avery O. T. (Эйвер) 601, 620, 660, 673
- Bachmann B. 37
- Baglioni C. (Бальони) 356, 601
- Bailey W. T. 356, 601
- Bacq Z. M. (Бак 3) 32
- Balboni E. R. 32
- Balis M. E. (Бейлис) 32
- Baltimore D. (Балтим) 32
- Bangham A. D. 124
- Barclay R. K. (Баркл) 384, 394
- Barigozzi C. 384, 394
- Barner H. D. 652
- Barnett L. 366, 452
- Baron L. S. (Барон) 497, 501
- Barondes S. H. 652
- Barr M. L. 497, 501
- Barratt R. W. 161
- Basilio C. 461, 659
- Bateson W. (Батсон) 560, 603
- Bauer H. (Бауэр) 170
- Baumiller R. C. (Баум) 447
- Bautz E. K. F. 447
- Beadle G. W. (Бидл) 447

Ссылки на страницы
44 И. Гершкович.

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ *

- Abelson P. H. 527
 Adams J. N. 633
 Adelberg E. A. (Адельберг Е. А.) 319, 330, 334—336, 340, 342, 352, 368, 371, 376, 416, 435, 476, 618, 665, 674
 Adler J. 601
 Akinrimisi E. O. 319
 Alexander P. (Александр П.) 202, 215
 Allen J. M. 476, 519
 Allen M. K. 315, 319
 Allfrey V. G. (Олфри В.) 444, 447, 504, 505, 507—510, 651
 Allison A. C. 230
 Altenburg (Альтенбург) 563, 564, 566
 Amano T. (Аmano Т.) 606, 610
 Ames B. N. 476, 618, 674
 Anderson T. F. 333, 607, 632
 Anfinsen C. B. (Анфинсен С.) 431, 435
 Arber W. 349, 352, 632
 Арнотт С. 579, 582, 585
 Arnstein H. R. V. 659
 Asano K. 652
 Astbury W. T. (Астбери В.) 578, 590
 Astrachan L. (Астрахан Л.) 644, 651, 663, 674
 Attardi G. 651, 674
 Auerbach C. (Ауэрбах Ш.) 176, 243, 567, 574
 August J. T. 447
 Avery O. T. (Эйвери О.) 319, 577, 590, 601, 620, 660, 673
 Bachmann B. 37
 Baglioni C. (Бальони К.) 429, 435, 446
 Bailey W. T. 356, 673
 Bacq Z. M. (Бак З) 202
 Balboni E. R. 32
 Balis M. E. (Бейлис М.) 471, 476
 Baltimore D. (Балтимор Д.) 380, 381
 Bangham A. D. 124
 Barclay R. K. (Барклей Р.) 582, 590
 Barigozzi C. 384, 394
 Barner H. D. 652
 Barnett L. 366, 452
 Baron L. S. (Барон Л. С.) 628, 632
 Barondes S. H. 652
 Barr M. L. 497, 501
 Barratt R. W. 161
 Basilio C. 461, 659
 Bateson W. (Батсон У.) 55, 61, 63, 559, 560, 603
 Bauer H. (Бауэр) 176, 562
 Baumiller R. C. (Баумиллер Р.) 234
 Bautz E. K. F. 447
 Beadle G. W. (Бидл Дж. В.) 136, 160, 161, 422, 435, 522, 569, 601, 610—613, 617—620, 653, 660, 666, 673
 Beale G. H. 394, 469, 610
 Bearn A. G. 192, 435
 Becker E. 610
 Becker H. J. 503, 509
 Becker Y. 439, 447
 Beckwith J. R. 674
 Beermann W. 503, 506, 510
 Beers R. F. 279
 Belling J. (Беллинг Дж.) 164, 170, 176, 244
 Bender M. A. 202
 Bendich A. 289, 291
 Bennett D. (Беннетт Д.) 91
 Bennett T. P. 461
 Benzer S. (Бензер С.) 357, 361, 364, 366, 406, 416, 452, 453, 461, 615, 618, 632, 660, 673
 Berg P. (Берг П.) 303, 305, 407, 442, 634, 641, 645, 651
 Bergmann F. H. 634
 Bernal J. D. (Бернал Дж. Д.) 576
 Bertsch L. L. 305
 Bessman M. J. (Бессмен М. Дж.) 305, 469, 601
 Beutler E. 496, 501
 Billeter M. A. 382
 Binnington J. P. 202
 Birnstiel M. L. 441, 447
 Bishop J. 652
 Bladen H. A. 447
 Blakeslee A. F. (Блексли А. Ф.) 164, 170, 176, 244
 Blinkova A. A. 674
 Bloch D. P. 510
 Blum H. F. 527
 Boedtker H. 632
 Boehner L. 357, 366
 Boice L. (Бойс Л.) 511
 Boizman B. 514, 518
 Bollum F. J. (Боллум Ф.) 302, 305, 597, 601
 Bolton E. T. 651
 Bonhoeffer F. 674
 Bonner D. M. (Боннер Д. М.) 435, 439, 448, 608, 618
 Bonner J. (Боннер Дж.) 507, 508, 510, 516
 Bonnevie (Бонневи) 569
 Borek E. (Борек) 442
 Borsook H. 650
 Borst P. 382
 Bourgeois S. 674
 Boveri T. (Бовери Т.) 21

* Ссылки на страницы, выделенные полужирным шрифтом, относятся к фотографиям.

Boyce R. P. 411, 416
 Boyer S. H. 435
 Brachet J. (Браше) 22, 37, 577, 590, 636, 650, 674
 Bradshaw A. D. 36
 Bragg W. L. (Брегр В. Л.) 577
 Brehme K. S. 37, 176
 Bremer H. 674
 Brenner S. (Бреннер С.) 353, 366, 447, 452, 644, 651, 663, 674
 Bresler S. E. 674
 Bretscher M. S. 659
 Brewen J. G. 196, 202
 Bridges C. B. (Бриджес К. Б.) 37, 104, 109, 112, 124, 167, 486, 494, 561, 573, 607
 Briggs R. (Бриггс Р.) 512, 632
 Brink R. A. (Бринк Р. А.) 477, 482, 483, 484
 Brown A. 651
 Brown B. 618
 Brown D. D. (Браун Д. Д.) 440, 447, 512
 Brown D. F. 482, 484
 Brown G. L. (Браун Дж.) 582, 587, 588, 590
 Bryson V. 305, 632
 Bunker M. C. 173, 176
 Burdette W. J. 176, 215
 Burdon R. H. 382
 Burnet F. M. (Бернет Ф.) 381, 628, 632
 Burnham C. R. (Бернхем) 136
 Burns S. N. (Бернс С.) 340, 342, 368, 376, 674
 Burrous J. W. 633
 Burton K. 305
 Butenandt A. (Бутенандт А.) 606, 610, 612
 Busch H. (Буш Г.) 509
 Byrne R. (Байрн Р.) 444, 447, 474

 Cairns J. (Кернс) 340, 342, 466, 469, 674
 Calef E. 618
 Calvin M. 527, 528
 Callan H. G. (Каллан Х.) 505, 510
 Campbell A. M. (Кэмпбелл А.) 349, 352, 371, 376, 390, 394, 461, 632
 Campbell P. L. 516, 518
 Canellakis E. S. 305
 Cannon M. (Кеннон М.) 646, 652
 Carey W. F. 632
 Carlson E. 416
 Carlson J. C. 195
 Carlton B. C. 461
 Caro L. G. 674
 Carothers E. 29, 36
 Carrier W. L. 411, 416
 Case M. E. 618
 Caspar D. L. D. (Каспар Д.) 637, 651
 Caspersson T. (Касперссон Т.) 576, 578, 590, 636, 650, 674
 Caston J. D. (Кастон И.) 512
 Cavaliere L. F. 303, 305
 Cavalli-Sforza L. L. 632
 Cecere M. A. 674
 Cerhova M. 305
 Chamberlin M. (Чемберлен М.) 305, 645, 651
 Champe S. P. (Чэмп С. П.) 361, 366, 452, 453, 461
 Chandler B. L. 289, 291

Chendler M. 447
 Chang R. S. (Чанг Р.) 509
 Chargaff E. (Чаргафф Э.) 279, 300, 305, 578, 590, 601
 Chase M. (Чейз М.) 353, 357, 367, 590, 620, 632, 651, 673, 674
 Chesley P. (Чесслей П.) 91
 Червериков С. С. 7
 Chevais S. (Шёве С.) 612, 617
 Chèvremont M. 391, 394
 Childs B. 496, 498, 501
 Chipchase M. J. H. 441, 447
 Chovnick A. 492, 494
 Chu E. H. Y. 202, 243
 Cilden R. V. 510
 Clark A. J. (Кларк А.) 342, 371, 376
 Clark F. 527
 Clark J. 395
 Claus W. D. 202
 Clayeter H. S. 651
 Cleland R. E. (Клеланд Р. Е.) 17, 24—26, 244, 248, 249, 256
 Clever U. 503, 510
 Clowes R. C. 381
 Cock A. G. 501
 Cohen S. S. (Коэн С. С.) 445, 466, 469, 601, 632, 652
 Cohn E. 659
 Cohn M. 618, 674
 Cohn W. E. 279, 447
 Colter J. S. 651
 Cooper K. W. 200, 202
 Cordova C. C. 515, 518
 Corey R. B. 650
 Correns (Корренс) 559, 602
 Coulon E. M. 506, 510
 Cowan C. A. 394
 Cowie D. B. 350, 528
 Cox E. C. 447
 Craig L. C. 427, 435
 Crawford L. P. 424, 435, 634
 Creighton H. S. (Крайтон) 136, 140
 Crick F. H. C. (Крик Ф.) 282, 286, 289—291, 304, 409, 447, 450, 461, 579—582, 590, 592, 622, 632, 640, 650, 660, 670, 674
 Crow J. F. 75, 215, 224, 230, 232, 234, 243, 400
 Cuénot (Кэно) 559
 Cuzin F. (Кузен Ф.) 672, 674
 Dais D. 458, 461
 Daly M. M. 651
 Darwin (Дарвин) 562, 568, 609
 Darlington C. D. (Дарлингтон К. Д.) 22, 36, 392
 Davern C. I. 651, 674
 David J. B. 391
 Davidson D. R. 496, 501
 Davidson E. H. 510
 Davidson J. N. 278, 447, 601, 659
 Davidson P. F. 366
 Davies D. R. 319
 Davies M. 651
 Davis B. D. 618
 Davis J. E. 377
 Day P. R. 37
 Deasy C. L. 650
 Deering R. A. 416
 DeGeorge F. V. 96
 Delbrück M. (Дельбрюк М.) 356, 564, 632, 650, 660, 663, 673

Dellweg Z.
 DeMars R.
 Demerec
 345, 402
 666, 674
 Denhardt
 511
 DeRobert
 DeVries H.
 562, 602
 Dewey V.
 Dieckmann
 Dintzes H.
 646, 652
 Dintzis M.
 Dixon J.
 Dobzhansky
 176, 220
 258, 259
 Dodge B. C.
 617
 Dodson E.
 Doermann
 Doi R. H.
 Doty P. (C)
 651
 Doudney C.
 Dunn L. C.
 633
 Dunnebach
 Duryee W.
 du Vigneau
 Dya A. G.

 Eagle H.
 Eakin R.
 Edelman M.
 Ebert J. D.
 Edgar R. S.
 511
 Edwards J.
 Edwards P.
 Egyházi E.
 Ehrensverd
 Ehrlich P.
 Ehrman L.
 Eigner J.
 Eizenberger
 Elder A. (C)
 Ellis D. B.
 Elson D. (C)
 Emerson R.
 Emerson S.
 Engelberg J.
 Engelhardt
 Enger M. D.
 Ephrussi B.
 514, 518,
 617
 Ephrussi-Tay
 311, 319,
 Epling C. (C)
 Epstein H. T.
 Epstein R. H.
 Evans A. H.

 Fairbanks V.
 Falconer D. S.
 Falkow S. 31
 Fancher H. 3
 Fano (Фано)

Dellweg Z. 601
 DeMars R. 498, 501
 Demerec M. (Демерек М.) 37, 188, 339,
 345, 402, 403, 407, 518, 610, 615, 632,
 666, 674
 Denhardt G. H. (Денхардт Г.) 357, 367,
 511
 DeRobertis E. D. (де Робертис Е.) 36
 DeVries H. (де Фриз Г.) 244, 255, 559,
 562, 602
 Dewey V. C. 601
 Dieckmann M. 634
 Dintzes H. (Динциц Г., Динцес Г.) 443,
 646, 652
 Dintzis M. (Динцис) 654, 659
 Dixon J. 651, 674
 Dobzhansky Th. (Добжанский Ф.) 77, 96,
 176, 226, 230—232, 234, 236, 243,
 258, 259, 263, 267, 550
 Dodge B. O. (Додж Б. О.) 607, 608, 612,
 617
 Dodson E. O. 267
 Doermann A. H. 357, 366
 Doi R. H. 513, 518
 Doty P. (Доти П.) 315, 319, 590, 632,
 651
 Doudney C. O. 632
 Dunn L. C. (Данн Л.) 87, 91, 267, 550,
 633
 Dunnebacher T. H. (Дуннебахер Т.) 509
 Duryee W. R. (Дюрье В.) 505
 du Vigneaud V. (дю Виньо) 612, 618
 Dya A. G. 439

Eagle H. (Игл Г.) 616, 618
 Eakin R. 524, 527
 Edelman M. 386, 394
 Ebert J. D. (Эберт) 518
 Edgar R. S. (Эдгар Р. С.) 357, 367,
 511
 Edwards J. H. 71, 75
 Edwards P. R. 633
 Egyházi E. 515, 518
 Ehrensward G. 618
 Ehrlich P. R. (Эрлих П.) 267
 Ehrman L. 263, 267
 Eigner J. 319
 Eizenberger H. 651
 Elder A. (Элдер А.) 471
 Ellis D. B. 467, 469
 Elson D. (Элсон Д.) 445, 448, 640, 651
 Emerson R. A. (Эмерсон Р.) 136, 161
 Emerson S. (Эмерсон С.) 244, 607
 Engelberg J. 461
 Engelhardt D. 379
 Enger M. D. 381
 Ephrussi B. (Эфрусси Б.) 391, 394, 433,
 514, 518, 604—607, 609, 610, 612,
 617
 Ephrussi-Taylor H. (Эфрусси-Тейлор Г.)
 311, 319, 433, 582, 590
 Epling C. (Эплинг К.) 258
 Epstein H. T. 394
 Epstein R. H. 511, 518
 Evans A. H. 515, 518

Fairbanks V. F. 496, 501
 Falconer D. S. 75, 550
 Falkow S. 319
 Fancher H. 305
 Fano (Фаво) 566

Faulkner R. 508, 509
 Ferguson-Smith M. A. (Фергюсон-Смит
 М.) 173
 Felsenfeld S. 507, 510
 Feughelman M. 593, 601
 Fiala J. 445, 448
 Finch J. T. 381
 Fincham J. R. S. 37, 618
 Flax J. G. 447, 601
 Flemming W. (Флеминг В.) 22, 615
 Fling M. 610, 618
 Fogel S. 22, 37, 140, 230, 279
 Fong P. 466, 469
 Fowler W. M. 496, 502
 Fox M. S. 314, 315, 319
 Fox S. W. (Фокс С.) 522, 527, 528, 609,
 610
 Fraenkel D. 652
 Fraenkel-Conrat H. (Френкель-Конрат
 Г.) 379—382, 461
 Francis C. M. 516, 518
 Francis T. (Френсис Т.) 90
 Franklin N. 674
 Franklin R. (Франклин Р.) 579
 Fraser A. C. 161
 Fraser D. K. 633
 Fred E. B. (Фред Э. Б.) 611
 Fredericq P. (Фредерик П.) 373, 376
 Freese E. (Фриз Э.) 416, 632
 Freese E. B. 413, 416
 Freiman A. E. 618
 Fregin A. 514, 519
 Freifelder D. 366
 Freire-Maia N. 243
 Frenster J. H. 508, 510
 Fresco J. R. 632
 Friedman J. 514, 519
 Fries N. (Фриз Н.) 608, 612, 618
 Fuerst C. 674
 Fuller W. (Фуллер В.) 587, 588, 590
 Furth J. J. 447

Gabriel M. L. 22, 37, 140, 230, 279
 Гаврилова Л. П. 436, 442
 Gaebler O. H. 610, 633, 634
 Gaffron H. (Гаффрон Г.) 521
 Gahan P. B. 505, 510
 Gaines K. 674
 Gall J. G. (Галл П.) 505, 510
 Gallant J. 476
 Ganesan A. T. 674
 Gardner R. S. 461, 659
 Garen A. (Гарен А.) 453, 471, 476
 Garnjobst L. 161, 618
 Garrod A. E. (Гаррод А.) 418, 602—604,
 606—610
 Gartner T. K. 475, 476
 Gary B. 674
 Gates R. R. 48
 Gay H. 447
 Geiduschek E. P. 447
 Gellert M. 319
 German J. L. 192
 Gesteland R. 652
 Giacomoni D. (Джиакомони Д.) 442,
 447, 458
 Gibson I. (Джибсон И.) 467, 469
 Gierer A. (Гирер А.) 379, 381, 652,
 674
 Gilbert W. (Джилберт В.) 442, 447, 644,
 646, 647, 651, 652, 674

Gilden R. 508
 Giles N. H. 202, 243, 610, 618
 Gish D. T. 382
 Glass B. 352, 366, 367, 518, 601, 632, 633, 673
 Gluecksohn-Waelsch S. 96
 Glover S. W. 610
 Glowacki E. R. 651
 Godoy G. A. 395
 Goebel W. F. 373, 376
 Gold M. (Голд М.) 442
 Goldberg B. D. 514, 519
 Goldhaber P. (Голдхабер П.) 509
 Goldman M. 447
 Goldschmidt R. B. (Гольдшмидт Р. Б.) 95, 96, 124, 609
 Goldstein J. 458, 461
 Golomb S. W. 632
 Gornatos P. J. 380, 381
 Gonano F. 461
 Gooch P. C. 202
 Goodman H. M. (Гудмен Г.) 458, 461
 Gordon J. A. 319
 Gorini L. 476, 618
 Gots J. S. 610
 Gowen J. W. 230
 Green D. E. (Грин Д.) 391, 394, 528
 Green H. 514, 519
 Green M. 290
 Green M. H. 350, 440, 447
 Green M. M. 500
 Greer S. (Грир С.) 415
 Grell E. H. 37
 Griffen A. B. 173, 176
 Griffith F. (Гриффит Ф.) 309, 620, 632
 Groman N. B. 465, 469
 Gross F. 447, 651, 652, 674
 Gross J. 651
 Gross P. R. (Гросс П. Р.) 509
 Gross S. R. 618
 Grossman L. (Гроссман Л.) 460
 Grötsch H. 523
 Grumbach M. M. 496, 501
 Grunberg-Manago M. (Грюнберг-Манаго М.) 461, 656, 659
 Grüneberg H. 96
 Guest J. R. 461
 Guidotti G. 427, 435
 Gulland J. M. (Гулланд Дж.) 578, 590
 Gurdon J. B. (Гурдон Дж. Б.) 440, 447
 Gustafsson (Густафссон) 569
 Guthrie G. D. 354, 366
 Guttman B. 674

 Haagen-Smit A. (Хаген-Смит А.) 612, 617, 650
 Haas F. L. 632
 Habermann U. 305
 Habermannova S. 305
 Hadorn E. (Хадорн Е.) 78, 96
 Haldane J. B. S. (Холдейн Дж.) 105, 609, 610
 Hall B. 403, 651
 Hall B. D. 447
 Hall C. E. 651
 Hallman G. (Халлман) 606, 610
 Hamburger V. (Гамбургер) 87
 Hamilton L. D. (Гамильтон Л.) 582, 590
 Hamilton M. G. 651

Hamilton T. H. 516, 518
 Hammarsten E. (Хаммарстен Е.) 578, 590
 Hanafusa H. 366
 Hanafusa R. 366
 Hannah-Alava A. 124
 Hanson (Хансон) 565
 Hardy G. H. 230
 Harm W. 364, 367
 Harnden D. 496
 Harrington H. 407, 416
 Harris H. 435, 514, 518
 Harris J. I. 651
 Harris W. (Харрис В.) 228, 230
 Hart R. G. (Харт Р. Дж.) 378
 Hartman P. E. (Хартман П.) 347, 348, 474, 476, 610, 618, 632, 674
 Hartman Z. 610, 632
 Haruna I. (Гарун И.) 380
 Harvald B. (Харвалд Б.) 96
 Haskell G. 37
 Haslbrunner E. 395
 Hauge M. (Хауджа М.) 96
 Hayashi M. 447, 651, 674
 Hayashi M. N. 447
 Hayes D. 652
 Hayes W. (Хэйс У., Хейс В.) 331, 334, 342, 367, 371, 373, 376, 634, 673
 Hecht L. I. 632, 651
 Hechter O. 528
 Hede R. 366
 Heinrich M. R. 601
 Heitz E. (Хейтс Е.) 176, 570
 Helinski D. R. (Хелинский Д.) 362, 367, 461
 Henning M. 461
 Herriot R. M. 319
 Heritier P. L. 394
 Hershey A. D. (Херши А.) 352, 356, 357, 367, 578, 590, 601, 620, 632, 643, 651, 660, 663, 673
 Herskowitz I. H. (Гершкович И.) 37, 198, 234, 243, 406, 416
 Hess O. 506
 Hiatt H. 447, 651
 Higa A. 652
 Hinegardner R. T. 461
 Hiraizumi Y. (Хираицуми И.) 400, 401, 403
 Hirota Y. (Хирога) 628, 632
 Hirst G. K. 377, 381
 Hoagland M. B. (Хогленд М.) 447, 640, 641, 651
 Hochstim A. R. 522, 528
 Hogness D. S. 352
 Holland J. J. 467, 469, 505, 510
 Hollaender A. (Холлендер А.) 192, 215, 566, 567
 Hollingworth B. R. 651, 674
 Holm R. W. (Холм Р.) 267
 Holtz A. M. (Холтц А.) 77, 96
 Honlahan B. M. 618
 Hoogsteen K. 590
 Hooper C. W. 590
 Hopkins J. W. (Гопкинс Дж. В.) 440, 448, 645, 651
 Horn E. C. 510
 Horne R. W. 366, 381
 Horowitz N. H. (Горовиц Н. Г.) 525, 528, 608—610, 618
 Hotchkiss R. D. 319, 632

Hotta Y.
 Howard M.
 Howard-Fr.
 Hoyer B.
 Hsia D. Y.
 Hsu T. 17
 Huang R.
 Huang S.
 Hultin T.
 Hurwitz J.
 674
 Hutner S.
 Huxley H.
 Hydén H.
 Hymer W.
 Hudson W.

 Igarashi R.
 Iijima T.
 Iino T. 633
 Imamoto R.
 Ingerman
 Ingram V.
 435, 614,
 Inhorn S.
 Iritani H.
 Ishida M.
 Itano H. A.
 Ito J. 674
 Izawa M. (I)

 Jackson J.
 Jacob F. (J)
 342, 352,
 632, 634,
 Jahba A. J.
 Janaki-Amn
 Janssens (Я)
 Jehle H. 24
 Jenks W. P.
 Johannsen V.
 21, 22
 John B. 37,
 Johnston A.
 Joklik W. K.
 Jones O. W.
 Jordan D. C.
 Jordan P. (J)
 Josse J. 601
 Jukes T. (J)
 Junsalus C.

 Kaesberg P.
 Kaiser A. D.
 Kallman F.
 Kammen H.
 Kaplan W. D.
 Karpechenko
 265
 Kano-Sueoka
 Katoh A. 50
 Kaufmann B.
 566, 567
 Keighley G.
 Kellenberger
 367
 Keller E. B.
 Kempthorne C.
 Kendrew J. S.
 Keosian J. 52

Hotta Y. 504, 510, 513, 518, 519
 Howard M. 659
 Howard-Flanders P. 411, 416
 Hoyer B. H. 319, 513, 518, 651
 Hsia D. Y.-Y. 435
 Hsu T. 172
 Huang R. C. C. (Хуанг Р.) 439, 508, 510
 Huang S.-S. 528
 Hultin T. 650
 Hurwitz J. (Гурвиц Дж.) 439, 442, 447, 674
 Hutner S. H. 634
 Huxley H. E. (Хаксли) 568, 638, 651
 Hydén H. 515, 518
 Hymer W. C. (Хаймер В. Ц.) 445, 447
 Hudson W. R. 381

 Igarashi R. T. 513, 518
 Iijima T. (Ииджима Т.) 628, 632
 Iino T. 633
 Imamoto F. 674
 Ingeman M. L. 291
 Ingram V. M. (Инграм В.) 425, 427, 431, 435, 614, 618
 Inhorn S. L. 176
 Iritani H. 610
 Ishida M. R. 386, 395
 Itano H. A. 429, 435
 Ito J. 674
 Izawa M. (Ицава М.) 504, 505, 510

 Jackson J. F. 305
 Jacob F. (Жакоб Ф.) 333, 335, 337, 341, 342, 352, 363, 367, 376, 447, 476, 627, 632, 634, 643, 644, 651, 660, 673
 Jahba A. J. 659
 Janaki-Ammal E. K. 22
 Janssens (Янссенс) 560
 Jehle H. 24, 36, 291
 Jenks W. P. 319
 Johannsen W. L. (Иогансен В. Л.) 8, 21, 22
 John B. 37, 161
 Johnston A. W. (Джонстон А. В.) 173
 Joklik W. K. 439, 447
 Jones O. W. 461, 476, 659
 Jordan D. O. 590
 Jordan P. (Иордан П.) 578, 635, 650
 Josse J. 601
 Jukes T. (Джакс Т.) 456, 461
 Junsalus C. 352

 Kaesberg P. 381
 Kaiser A. D. 352, 367
 Kallman F. J. 96
 Kammen H. O. 305
 Kaplan W. D. 498, 502
 Karpechenko G. D. (Карпеченко Г. Д.) 265
 Kano-Sueoka T. 514, 519
 Katoh A. 504, 510
 Kaufmann B. P. (Кауфман) 37, 165, 189, 566, 567
 Keighley G. 650
 Kellenberger E. 306, 349, 352, 364, 367
 Keller E. B. 651
 Kempthorne O. 550
 Kendrew J. S. (Кендрию Дж.) 435, 635
 Keosian J. 528

Kerkis (Керкис) 563
 Kermickle J. L. 482, 484
 Kernaghan R. P. 492, 494
 Kessinger M. A. (Кессингер М. А.) 228, 230
 Keynan A. 652
 Khorana H. G. 305
 Khouvine Y. (Хувин И.) 606, 612, 617
 Kidder G. W. 601
 Kido S. 674
 Kiesselbach T. A. 37
 Kihara H. (Кихара Г.) 266
 Kilksen R. 352, 367
 Kim Y. T. 381
 King T. J. (Кинг Т.) 512, 632
 Kinosita R. 498, 502
 Kjeldgaard N. 633
 Klein E. 618
 Klein G. 618
 Kluyver A. V. (Клюйвер А.) 633
 Knight B. C. J. G. 633
 Knight C. A. 382
 Knopf P. M. 652
 Knop W. E. 610
 Kögl F. (Кёгль Ф.) 611, 612, 618
 Kohiyama M. 674
 Koller (Коллер) 574
 Konetzka W. A. 340, 342
 Konigsberg W. 427, 435
 Konrad M. W. 674
 Kornberg A. (Корнберг А.) 293, 305, 416, 468, 469, 552, 591, 601, 633, 653, 670, 674
 Kornberg S. R. 601
 Koshland D. E. 601
 Kossikov K. V. (Косиков К.) 494
 Kostyanovskii R. G. (Костяновский Р. Г.) 290, 291
 Krakow J. S. 303, 305, 440, 447
 Krauss M. 492, 494
 Krieg D. R. 416
 Krieger H. 243
 Krug R. (Круг Р.) 646, 652
 Kubitschek H. E. 416
 Kuff E. L. (Кафф) 445, 447
 Kurek L. I. 618
 Kurland C. G. (Курланд) 447, 639, 644, 651

 Lamfrom H. 651 674
 Lampen J. O. 305
 Landauer W. (Ландауер В.) 87, 96
 Landsteiner K. (Ландштейнер К.) 65, 643
 Lane D. 319
 Langridge R. 590, 601
 Lanzov V. A. 674
 Lark K. G. 674
 Larsson A. 463, 469
 Laughnan J. R. 489, 494
 Law L. W. 618
 Leahy J. 652
 Leboy P. S. 447
 Leder P. (Ледер П.) 457, 461, 474
 Lederberg E. M. (Ледерберг Э. М.) 321, 323, 329, 330, 352, 613, 628, 633, 634, 673
 Lederberg J. (Ледерберг Дж.) 321, 323, 327, 328, 329, 330, 343 346, 349, 352, 528, 553, 602, 611, 613, 618, 619, 632—634, 660, 661, 673, 674

Lee-Huang S. 303, 305
 Lehman I. R. 601
 Lemnon R. M. 528
 Lemox 346
 Lengyel P. 461, 659
 Leopold U. 610
 Lerman L. S. 310, 316, 319, 407, 416
 Levan A. 403
 Levene H. 550
 Levin J. G. 447
 Levine L. 319
 Levinthal C. (Левинталь) 366, 650, 652
 Levy M. 618
 Lewis E. W. (Льюис Е.) 490, 491, 494
 Lewis K. R. 37, 161
 L'Héritier P. (Лэритье П.) 384
 Li C. C. (Ли) 230, 566
 Lichtenstein J. 652
 Lima de Faria A. 392, 504, 510
 Lindegren C. C. (Линдгрэн К.) 607, 608, 612, 617, 634
 Lindsley D. L. 37
 Lipmann F. (Липман Ф.) 448, 459, 652, 659
 Lipsett M. N. 319
 Litman R. M. 317, 319
 Littau V. C. 507, 508, 509
 Littauer U. Z. (Литтауэр У.) 442, 651
 Littlefield J. 651
 Lively E. R. 633
 Locher (Лохер) 566
 Locke M. 518
 Lockhart R. Z. 468, 469
 Loeb T. 332, 377, 381
 Lowy P. H. 650
 Luck D. J. L. 391, 394
 Lunt M. R. 305
 Luria S. E. (Лурья С.) 348, 633, 635, 660, 673, 674
 Luzzati U. 291, 507, 510
 Lwoff A. (Львов А.) 607, 610, 611, 633, 660
 Lyon M. F. (Лайон М.) 496, 498, 502

 Maaløe O. 652, 674
 Maas R. 376
 Maas W. K. 618, 674
 Maitra U. 674
 MacDowell E. (Мак Дауелл И.) 90
 Mackenzie (Маккензи) 566
 MacLeod C. M. (Мак Леод К., Маклеод К.) 311, 319, 577, 590, 601, 660, 673
 Maestre M. F. 352, 367
 Magni G. E. (Маньи Г.) 396, 403
 Maheshwari N. (Магешвари Н.) 439
 Mahler I. 476
 Malin (Мелин) 569
 Makino S. 22
 Mandel M. 319
 Margolin P. 473, 476
 Mariner R. 528
 Markert C. L. 512, 518
 Marmur J. (Мармур Дж.) 315, 319, 375, 376, 465, 469, 476
 Martin R. G. 674
 Marvin D. A. 590
 Massey (Месси) 576
 Matsushiro A. 674
 Matthaei J. H. (Маттей Дж.) 453, 461, 645, 651, 655, 659

Maxwell E. S. 659
 Mayer E. 267
 Mazia D. (Мэзия Д.) 22
 McCarthy B. J. 319, 350, 505, 510, 513, 518
 McCarty M. (Маккарти М., Мак Карти М.) 319, 577, 590, 601, 673
 McClintock B. (МакКлинтон Б.) 136, 140, 398, 399, 403, 481, 483, 484
 McConkey E. H. (Мак Конкей И. Г.) 440, 448
 McCoy A. 634
 McElroy W. D. 352, 366, 518, 601, 632, 633, 673
 McFall E. 674
 McKusick V. A. (Маккьюсик В.) 124, 502
 McLaren A. D. 416
 McLeisch J. 37
 Mead C. G. 407, 416
 Melechen N. 308, 322
 Mendel G. (Мендель Г.) 49, 63, 551, 554, 558—560, 562, 566, 602
 Merchant D. J. 518
 Merrill D. J. 267
 Meselson M. (Мезельсон М.) 286, 287, 291, 364, 367, 447, 634, 643, 651, 663, 674
 Metz C. 252
 Metzenberg R. L. 618
 Meyer G. F. 506, 510
 Miescher F. (Мишер Ф.) 269, 279
 Miller R. S. 461
 Miller S. L. 528
 Mills S. E. 435
 Mirsky A. E. (Мирский А. Е.) 22, 37, 444, 447, 504—510, 651
 Mitchell H. K. (Митчелл Г. К.) 37, 391, 394, 435, 608, 610, 618
 Mitchell M. B. 391, 394
 Mitra S. 377, 381
 Mohr O. L. 48
 Monier R. 652
 Monod J. (Моно Ж.) 363, 473, 475, 476, 618, 634, 643, 644, 651, 660, 662, 665
 Montagu A. 96
 Moore J. A. (Мур Дж.) 512, 517, 518
 Moohr J. W. 446
 Moorhead P. S. 402, 403
 Morgan D. T. (Морган Д.) 188
 Morgan T. H. (Морган Т.) 98, 109, 140, 551, 559, 562, 607, 612
 Mokirawa N. 674
 Morishima A. 496, 501
 Morse M. L. 352, 634
 Morton N. E. (Мортон Н.) 232, 234, 243
 Mosig G. 367
 Mott-Smith (Мотт-Смит) 567
 Muench K. (Менц К.) 442
 Mukai F. H. 472, 476
 Muller H. F. (Меллер Г. Дж.) 37, 192, 200, 202, 209, 210, 212, 213, 215, 232—234, 243, 412, 416, 486, 494, 500, 502, 570, 571, 576, 609, 610, 612, 634
 Muntzing A. 243

 Nagai (Нагаи) 566
 Nagata T. 340, 342
 Nagel E. 634
 Nägeli C. (Нэгели) 554

Nakamoto
 Nance W. I.
 Nanney D.
 Naono S. 6
 Naselkorn I.
 Nathans D.
 Naughton
 Naumann
 Nebel B. R.
 Neel J. V.
 Neihardt F.
 Nelson N. J.
 Ness O. 51
 Newmann I.
 Newmeyer I.
 Nichols W.
 Nicolaieff A.
 Nirenberg
 447, 454,
 651, 652,
 Niu L. C. 5
 Niu M. C. 5
 Nitowsky H.
 Nobel A. (Н)
 Nomura M.
 Nordqvist T.
 Norris A. T.
 Nossal G. J.
 Notani G. 4
 Novick A. 4
 Novitski E.
 Nowinski W.
 Nozu K. (Н)
 Nye J. F. 6

 Ochoa S. (О)
 656, 658
 O'Connor C.
 Oehlkers F.
 Ohno S. 498
 Ohtaka Y. (О)
 Ofengand E.
 Offermann (О)
 Oliphant (Ол)
 Oliver (Оливе)
 Olson M. E.
 Oparin A. I.
 Orgel L. (Ор)
 Orlas E. 474
 Ørskov F. 63
 Ørskov I. 634
 Osborn F. 96
 Osborn R. H.
 Oster I. (Ост)
 Östergren G.
 Otsuji N. (От)
 Ottolenghi E.
 Oyama V. I.
 Ozeki H. 346

 Painter T. S.
 Paranchych V.
 Pardee A. B.
 651, 662, 6
 Parke W. C.
 Parks R. E. 6
 Parsons D. 3
 Partridge C. V.
 Passano K. 20
 Patau K. 176
 Pateman J. A.

Nakamoto T. 447
 Nance W. E. 435
 Nanney D. L. 634
 Naono S. 651, 652, 674
 Naselkorn R. 382
 Nathans D. 454, 461
 Naughton M. A. 659
 Naumann J. 476
 Nebel B. R. 506, 510
 Neel J. V. (Ниль Дж.) 48, 518
 Neihardt F. C. 652
 Nelson N. J. 618
 Ness O. 510
 Newmann H. H. 96
 Newmeyer D. 161
 Nichols W. W. 402, 403
 Nicolaieff A. 507, 510
 Nirenberg M. W. (Ниренберг М. В.) 447, 454, 457, 459, 461, 474, 476, 645, 651, 652, 655, 656, 659
 Niu L. C. 515, 518
 Niu M. C. 515, 518
 Nitowsky H. 496
 Nobel A. (Нобель А.) 617
 Nomura M. (Номура М.) 644, 651
 Nordqvist T. 504, 510
 Norris A. T. 442, 448
 Nossal G. J. 514, 518
 Notani G. 461
 Novick A. 404, 416, 634, 674
 Novitski E. 37
 Nowinski W. W. (Новинский В.) 36
 Nozu K. (Нозу К.) 380
 Nye J. F. 618

 Ochoa S. (Очоа С.) 382, 440, 447, 459, 656, 658
 O'Connor C. M. 634
 Oehlkers F. (Элкерс Ф.) 244
 Ohno S. 498, 502
 Ohtaka Y. (Отака И.) 380, 474, 476
 Ofengand E. J. 634, 651
 Offermann (Офферманн) 570
 Oliphant (Олифант) 576
 Oliver (Оливер) 565
 Olson M. E. (Олсон М. Е.) 438
 Oparin A. I. (Опарин А. И.) 528, 609
 Orgel L. (Оргел Л.) 610
 Orlas E. 474, 476
 Orskov F. 634
 Orskov I. 634
 Osborn F. 96
 Osborn R. H. 96
 Oster I. (Остер Дж.) 577
 Östergren G. 403
 Otsuji N. (Отсуйи Н.) 471, 476
 Ottolenghi E. (Оттоленги Е.) 311
 Oyama V. I. 618
 Ozeki H. 346, 352, 610

 Painter T. S. (Пайнтер) 176, 570
 Paranchych W. 467, 469
 Pardee A. B. (Парди А.) 476, 618, 643, 651, 662, 663, 674
 Parke W. C. 291
 Parks R. E. 601
 Parsons D. 391, 394
 Partridge C. W. H. 618
 Passano K. 202, 243
 Patau K. 176, 192
 Pateman J. A. 618

Patterson J. T. 256
 Pattri H. O. E. (Паттри) 578, 590
 Pauling L. (Полинг Л.) 425, 579, 634—636, 650
 Pavlovsky O. 263, 267
 Peacock W. J. 289, 291, 503, 510
 Pearson C. M. 496, 502
 Penrose L. S. 528
 Perkins D. D. 161
 Perrin D. (Перрен Д.) 473, 476, 674
 Peterman M. L. 651
 Peters J. A. 22, 37, 109, 124, 140, 161, 176, 215, 230, 291, 319, 330, 381, 435, 494
 Petersen G. B. 305
 Peterson H. M. 489, 494
 Peterson P. A. 403
 Peterson W. H. (Петерсон В. Г.) 617
 Philipson L. 516, 518
 Piña M. (Пин М.) 290
 Pintner I. J. 634
 Pirie N. W. 634
 Plus N. 384, 394
 Pollister A. W. 392, 394
 Pollister P. F. 392, 394
 Pollman W. 523
 Pond V. 202
 Ponnampereuma C. 528
 Pontecorvo G. (Понтекорво Г.) 514, 565, 674
 Potter V. R. 279, 601
 Preiss J. 634
 Pritchard R. H. 674
 Provasoli L. 634
 Prokofyeva-Belgovskaya A. A. (Прокофьева-Бельговская А. А.) 494
 Ptashne M. 674
 Puck T. T. (Пак Т.) 194, 202, 616, 618
 Punnett (Пёнетт) 559, 560

 Raacke I. D. 445, 448
 Rabinovitz M. (Рабинович М.) 438
 Race R. R. 75
 Rabbill C. L. 515, 518
 Radding C. M. 601
 Ragni G. 311
 Ramachandran L. K. 381
 Randall J. T. (Рендалл Дж. Т.) 576, 577, 583, 590
 Rapoport I. A. (Рапопорт И. А.) 290, 291
 Rasmuson M. 230
 Ravin A. W. 319
 Raychaudhuri (Райхаудхьюри) 565
 Reddi K. K. 381, 467, 469
 Rees M. W. 366
 Reich E. 391, 440, 448
 Reichmann M. E. 458, 461
 Renner O. (Реннер О.) 244
 Révész L. 618
 Rhoades M. M. (Родс М. М.) 37, 136, 189, 385, 395, 570
 Rich A. (Рич А.) 443, 448, 458, 461, 523, 590, 636, 651, 652
 Richardson C. C. 305
 Richter A. 381, 634
 Riley M. (Рили М.) 476, 651, 663, 674
 Rinne F. (Ринн Ф.) 583, 590
 Ris H. 289, 291

Risebrough R. W. 447, 651, 652
 Ritter D. B. 651
 Roberts R. B. 674
 Robinson E. A. 429, 435
 Robson J. H. (Робсон Дж. Г.) 574
 Roeser J. 340, 342
 Roger M. 319
 Roizman B. 518
 Roscoe D. H. 465, 469
 Rosencranz H. S. 289, 291
 Rotman R. 356
 Rous P. (Paye П.) 616, 618
 Rouvière J. 674
 Rownd R. 319
 Rubenstein I. 367
 Rubin H. 366
 Ruddle F. H. 19, 22
 Rudnick D. (Рудник Д.) 87
 Rubland W. 395
 Rupert C. 364
 Russell L. B. 176, 192, 497, 502
 Russell W. L. (Рассел В.) 95
 Ryan F. J. (Райан Ф. Д.) 37, 608, 613, 634
 Ryter A. (Райтер А.) 672, 674

 Saez F. A. (Саэс Ф.) 36
 Sagan C. 528
 Sager R. (Саджер Р.) 386, 391, 395
 Saksela E. 402, 403
 Salas M. 674
 Salser J. S. (Салсер Дж.) 471
 Salyers A. A. 291
 Sampson M. 504, 510
 Sanchez C. (Санчес) 473, 476, 677
 Sandeen G. 507, 510
 Sander C. 319
 Sandler L. 401, 403
 Sang J. H. (Санджа Дж. Х.) 95, 96
 Sanger F. 634
 Sanger R. 75
 Sarabhai A. 458
 Sarkissian I. V. (Саркисян И. В.) 228, 230
 Sato K. 674
 Schachman H. K. (Шахман Г.) 596, 601
 Schalet A. 215, 416, 492, 494
 Schatz G. 391, 395
 Schechter A. N. 659
 Schiff J. A. 394
 Schildkraut C. L. 305, 319
 Schlessinger D. (Шлезингер Д.) 641, 642, 651, 652, 674
 Schlossberger H. 610
 Schmidt W. J. (Шмидт В.) 578, 583, 590
 Schrader F. (Шрадер Ф.) 22, 392
 Schramm G. 523
 Schreil W. 306
 Schrödinger E. (Шредингер Э.) 576, 634
 Schull W. J. (Шэлл У.) 48
 Schulman H. M. 448
 Schultz J. 269
 Schwander H. (Швандер) 577, 590
 Schwartz D. (Шварц Д.) 498
 Schwartz J. H. 461
 Schweet R. (Швит Р.) 442, 443, 646, 652
 Scott J. F. 651
 Seaman E. 375, 376
 Seecof R. L. 395

Seeds W. E. 601
 Seeds B. (Сидс Б.) 577
 Серебровский А. С. 7
 Setlow J. 410
 Setlow R. B. 410, 411, 416
 Shachman H. K. 651
 Shettles L. B. 118, 124
 Shipp W. 382
 Shirven R. M. 291
 Shoad B. 37
 Shugar D. 416
 Signer R. 590
 Siddigi O. H. (Сидики О.) 315, 319, 453
 Siebke J. C. 305
 Siminovitch L. 633
 Simmons N. S. 590
 Simms E. S. 601
 Simon E. H. 512
 Simon L. (Симон Л.) 380
 Singer B. 380, 382
 Singer E. (Сингер) 577, 578, 674
 Singer M. F. 454, 461, 475, 476
 Sinnott E. W. 550
 Sinscheimer R. L. 305, 354, 366, 377, 381, 596, 601
 Sinton W. M. 528
 Scott-Moncrief (Скотт-Монкриф) 569
 Slatis H. (Слатис Х.) 233
 Smellie R. M. S. 448
 Smith D. W. 176
 Smith M. 462, 469, 674
 Smith R. A. 381
 Snell G. D. (Снелл Дж.) 90
 Sobels F. H. 202
 Sokoloff L. 516, 518
 Somerville R. L. 674
 Sonneborn T. M. 387, 393, 395, 516, 517, 519
 Sorieul S. 514, 518
 Spahr P. (Спар П.) 442, 640, 651, 652
 Sparrow A. H. 202
 Spassky B. 253, 267
 Spector W. S. 22
 Spencer J. H. 300, 305
 Spencer M. (Спенсер М.) 587, 588, 590
 Speyer J. F. 461, 659
 Spiegelman S. (Спигельман С.) 380, 437, 439, 440, 442, 445, 447, 448, 458, 474, 634, 644, 645, 651, 674
 Spilman W. M. 632
 Spiess E. B. 230
 Spickett S. G. (Спикетт С. Г.) 242
 Spirin A. S. (Спирин А. С.) 436, 442, 448
 Spottswood T. 476
 Sprague G. F. 37, 230
 Spyrides G. J. 652
 Stadler L. J. (Стадлер Л. Дж.) 200, 567
 Stahl F. W. (Сталь Ф. В.) 286, 287, 291, 367, 634
 Stanier R. Y. 352, 651
 Stanley W. M. (Стенли) 381, 382, 568, 674
 Stauffer R. C. 634
 Stebbins G. L. 267
 Steffensen D. M. 168, 176, 289
 Stephenson M. L. 632, 651
 Steinberg J. 367
 Steiner R. F. 279
 Stent G. 291, 352, 366, 367, 416, 476, 626, 632, 634, 674

Stern C. 140, 2
 Stern H.
 Stevens A.
 Stevens J.
 Stocker I.
 Stokes A.
 Stone W.
 Stone W.
 Strauss N.
 Streisinger
 Strickberg
 Strickland
 Sturtevant
 158, 163
 607, 610
 Sueoka N.
 342, 514
 Sumner (C)
 Suomalainen
 Suskind D.
 Susman M.
 Sutton W.
 Sutton-Ger
 Swanson C.
 Swartz M.
 Synge R. I.
 Sypherd P.
 Szilard L.
 674
 Szybalska
 Szybalski V.
 Takahashi I.
 Tal M. 445
 Tamm I. 38
 Tarmy E. 3
 Tatum E. L.
 435, 553,
 620, 633,
 Tax S. 528
 Taylor A. L.
 402, 403
 Taylor J. H.
 Teissier G.
 Temin H. M.
 Temin R. G.
 Tergazhi B.
 Tessman I. (C)
 Thach R. E.
 Therman E.
 Thimann K.
 Thoman M. S.
 Thomas C. A.
 Timasheff S.
 Тимофеев-Рес
 Tissières A.
 674
 Todaro G. J.
 Todd S. A. 63
 Tolmach L. J.
 Torii M. 610
 Trautner T. A.
 Tschermak (C)
 Ts'o P. O. P.
 651
 Tsugita A. 38
 Tucker R. G.
 Tuppy H. 395
 Ullmann A. 6
 Umbarger H. E.

Stern C. (Штерн К.) 48, 86, 136, 137, 140, 230, 234, 502
 Stern H. 504, 510, 513, 518, 519
 Stevens A. (Стивенс А.) 439, 448
 Stevens J. G. 465, 469
 Stocker B. A. D. 346, 634
 Stokes A. (Стокс А.) 578
 Stone W. H. (Стон) 514, 519, 570
 Stone W. S. 256
 Strauss N. 476
 Streisinger G. 357, 366, 367, 601, 674
 Strickberger M. W. 37
 Strickland W. N. 37
 Sturtevant A. H. (Стертевант А.) 124, 158, 161, 244, 486, 494, 571, 604, 605, 607, 610
 Sueoka N. (Суэока Н.) 291, 301, 340, 342, 514, 519, 674
 Sumner (Самнер) 568
 Suomalainen E. 176
 Suskind D. R. 618
 Susman M. (Суссман М.) 511
 Sutton W. S. (Сеттон) 37, 559, 571
 Sutton-Gersch (Сеттон-Герш) 571
 Swanson C. P. (Свенсон) 22, 37, 566, 567
 Swartz M. N. 416
 Synge R. L. M. 521
 Sypherd P. S. 476
 Szilard L. (Сцилард Л.) 404, 416, 433, 674
 Szybalska E. H. 311, 319
 Szybalski W. 311, 317, 319, 632
 Takahashi I. 465, 469
 Tal M. 445, 448
 Tamm I. 380, 381
 Tarmy E. 375, 376
 Tatum E. L. (Татум Э. Л.) 325, 330, 422, 435, 553, 602, 604, 606—611, 617—620, 633, 634, 660, 673
 Tax S. 528
 Taylor A. L. 334, 335, 336, 338, 342, 402, 403
 Taylor J. H. 305, 416, 435, 496, 501
 Teissier G. (Тесье Г.) 384
 Temin H. M. 468, 469
 Temin R. G. 215, 234, 243
 Tergazhi B. E. 416
 Tessman I. (Тессман И.) 415, 512, 634
 Thach R. E. 674
 Therman E. 176
 Thimann K. (Тиманн К.) 606
 Thoman M. S. 338, 342
 Thomas C. A. 367
 Timasheff S. M. 651
 Тимофеев-Ресовский Н. В. 563—566
 Tissières A. (Тисьер А.) 638, 651, 652, 674
 Todaro G. J. 514, 519
 Todd S. A. 634
 Tolmach L. J. 310, 316, 319
 Torii M. 610
 Trautner T. A. 416
 Tschermak (Чермак) 559, 602
 Ts'o P. O. P. 319, 507, 510, 516, 651
 Tsugita A. 382
 Tucker R. G. 465, 469
 Tuppy H. 395
 Ullmann A. 674
 Umbarger H. E. 618

Urey H. C. 528
 Ursprung H. 512, 518

Van Beneden E. 37
 van Niel C. B. (Ван-Ниль К.) 633
 van Schaik N. W. 484
 van Wagtendonk W. J. 387, 395
 Vinograd J. 651
 Vogel H. J. 305, 618
 Volkin E. (Волкин) 644, 651, 663, 674
 von Ehrenstein G. 458, 461, 659
 von Euler H. 632
 von Halle E. S. 492, 494
 von Hippel P. H. 507, 510

Wacker A. 416, 601
 Waddington C. H. (Уоддингтон К.) 96, 519
 Wagner H. P. 176,
 Wagner R. P. 37, 435, 610
 Wahba A. J. 461
 Wallace B. 234, 243
 Wallace E. (Уоллес Е.) 31, 166, 167
 Waldo E. 659
 Waller J. P. (Уоллер) 639, 640, 651
 Ward (Уард) 566
 Warner J. R. (Уорнер Дж. Р.) 443, 446, 448, 652
 Watanabe T. 372, 376
 Watkins J. F. 514, 518
 Watson J. D. (Уотсон Дж. Д.) 282, 286, 289—291, 304, 409, 447, 448, 453, 553, 579—583, 587, 590, 592, 600, 601, 622, 634, 635, 650—655, 660, 664, 670, 673, 674
 Weidel W. (Велдейл В.) 602, 610
 Weigle J. 349, 352, 364, 365, 367, 601
 Weijer J. 37
 Weiler E. 519
 Weinberg W. 230
 Weinstein I. B. 659
 Weisblum B. 461, 659
 Weiss S. B. (Вейс С. Б.) 439, 447
 Weissmann A. (Вейсман А.) 20
 Weissmann C. (Вейсман К.) 380, 382
 Welch L. R. 632
 Welshons W. J. 492, 494, 502
 Westerholme D. R. 391
 Wexler I. B. 75
 Weygand F. 601
 White M. J. 176, 256
 Whiting P. W. 120, 124
 Wiener A. S. 75
 Wildman S. G. 381
 Wiley J. 37
 Wilkins M. H. F. (Вилкинс М., Уилкинс М.) 448, 552, 576, 590, 592, 601, 635, 653
 Williams R. C. (Вильямс Р. Ц.) 379, 381
 Willson C. 674
 Wilson E. B. (Вильсон Э. Б.) 35, 37
 Wilson H. R. 590
 Witowsky H. M. 501
 Wittmann H. G. 659
 Woese C. R. 461
 Wollman E. L. (Вольман Э. Л.) 333, 335, 337, 341, 342, 349, 352, 367, 376, 627, 632, 634, 661, 673, 674,
 Wolstenholme G. E. W. 528, 634

Wood H. G. (Вуд Г. Г.) 611, 617
Wood W. B. 651
Wright S. (Райт С.) 96, 227, 609, 610
Wright S. W. 497, 502
Wyatt G. R. 601

Yamada T. (Ямада Т.) 517
Yankovsky S. A. 437, 448
Yanofsky C. (Яновский) 362, 424, 435,
458, 461, 610, 618, 634, 674
Yates R. A. 618
Yeh M. 496, 501
Yoskikawa H. 340, 342, 674
Young J. 382

Yura T. (Юри Т.) 609, 610, 618

Zamesnik P. C. (Замечник Ф. К.) 438,
448, 632, 640, 651
Zamenhof S. (Заменгоф С.) 415
Zelle M. 327
Zetterqvist O. 516, 518
Zichichi M. L. 364, 367
Zimmer E. (Циммер Э.) 566, 613
Zimmerman S. B. 601
Zinder N. D. (Циндер Н. Д.) 332, 343,
346, 352, 377, 379, 381, 461, 633,
634
Zubay G. (Зьюбе Г.) 441, 448, 638,
651

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|------------|
| ПРЕДИСЛОВИЕ | <u>5</u> |
| I | |
| ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ И МИТОЗ | <u>9</u> |
| 2 | |
| МЕЙОЗ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ХРОМОСОМ | <u>23</u> |
| 3 | |
| РАСЩЕПЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ | <u>38</u> |
| 4 | |
| НЕЗАВИСИМАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ НЕАЛЛЕЛЬНЫХ ГЕНОВ | <u>49</u> |
| 5 | |
| МНОЖЕСТВЕННЫЕ АЛЛЕЛИ; МУЛЬТИГЕННЫЕ ПРИЗНАКИ | <u>64</u> |
| ■ | |
| ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ | <u>76</u> |
| 7 | |
| ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ И СЦЕПЛЕННЫЕ С ПОЛОМ ГЕНЫ | <u>97</u> |
| ■ | |
| ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА | <u>110</u> |
| 9 | |
| СЦЕПЛЕНИЕ И ПЕРЕКРЕСТ МЕЖДУ ГЕНАМИ | <u>125</u> |
| 10 | |
| РАСПОЛОЖЕНИЕ ГЕНОВ, КРОССОВЕРНЫЕ КАРТЫ | <u>141</u> |
| 11 | |
| ИЗМЕНЕНИЯ ЧИСЛА ХРОМОСОМ | <u>162</u> |
| 12 | |
| СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМ | <u>177</u> |
| 13 | |
| СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ХРОМОСОМ, ВЫЗВАННЫЕ ОБЛУЧЕНИЕМ | <u>193</u> |
| 14 | |
| ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ | <u>203</u> |
| 15 | |
| ГЕНОФОНД; ФАКТОРЫ РАВНОВЕСИЯ | <u>216</u> |

16

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОТЯГОЩЕННОСТЬ И ЕЕ
ВЛИЯНИЕ НА ПОПУЛЯЦИЮ

231

17

ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ, ВСТРЕЧАЮЩИ-
ЕСЯ
В ПРИРОДЕ

244

18

РАСЫ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ВИДОВ

257

19

ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ГЕНОВ

268

20

ОРГАНИЗАЦИЯ И РЕПЛИКАЦИЯ ДНК IN VIVO

280

21

РЕПЛИКАЦИЯ ДНК IN VITRO

292

22

КЛОНЫ. ТРАНСФОРМАЦИЯ. РЕКОМБИНАЦИЯ
НИТЕЙ IN VITRO

306

23

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ И КОНЪЮГАЦИЯ

320

24

ЭПИСОМА F

331

25

ТРАНСДУКЦИЯ

343

26

БАКТЕРИОФАГ. РЕКОМБИНАЦИЯ И ГЕНЕТИЧЕ-
СКИЕ КАРТЫ

353

27

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭПИСОМЫ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
РЕКОМБИНАЦИЯ

368

28

РНК КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

377

29

ВНЕЯДЕРНЫЕ ГЕНЫ

383

30

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ МУТИРОВАНИЯ

396

31

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ МУТАЦИЙ

404

32

ДЕЙСТВИЕ ГЕНА И ПОЛИПЕПТИДЫ

417

33

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СИНТЕЗ И РНК

426

| | | |
|-----|---|-----|
| 34 | ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОДИРОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ | 449 |
| 35 | РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ГЕНОВ | 462 |
| 36 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ. ОПЕРОНЫ | 470 |
| 37 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — СИСТЕМА ГЕННОГО КОНТРОЛЯ У КУКУРУЗЫ | 477 |
| 38 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ У ДРОЗОФИЛЫ | 485 |
| 39 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — ДОЗОВАЯ КОМПЕНСАЦИЯ | 495 |
| 40 | МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ РЕГУЛЯЦИИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ У ВЫСШИХ ОРГАНИЗМОВ | 503 |
| 41 | РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ГЕНА — РОСТ, ДИФФЕ- РЕНЦИРОВКА И РАЗВИТИЕ | 511 |
| 42 | ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНЕТИЧЕ- СКОГО МАТЕРИАЛА | 520 |
| | ДОПОЛНЕНИЕ И ПРИЛОЖЕНИЯ | 529 |
| | ДОПОЛНЕНИЕ | |
| | ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ СВЕДЕНИЯ ПО БИОМЕТРИИ | 530 |
| | ПРИЛОЖЕНИЯ | |
| I | ЧАСТЬ ПИСЬМА ГРЕГОРА МЕНДЕЛЯ НЭГЕЛИ | 554 |
| II | Т. Морган. ЗНАЧЕНИЕ ГЕНЕТИКИ ДЛЯ ФИЗИО- ЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ | 559 |
| III | Г. Меллер. ОБРАЗОВАНИЕ МУТАЦИЙ | 562 |
| IV | М. Вилкинс. МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА НУКЛЕ- ИНОВЫХ КИСЛОТ | 576 |
| V | А. Корнберг. БИОСИНТЕЗ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ | 591 |

VI

Джордж В. Бидл. ГЕНЫ И ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У НЕЙРОСПОРЫ

602

VII

Э. Л. Татум. ИСТОРИЯ ОДНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

611

VIII

Джошуа Ледерберг. ОБЗОР ГЕНЕТИКИ

619

IX

Дж. Д. Уотсон. РОЛЬ РНК В СИНТЕЗЕ БЕЛКОВ

635

X

Ф. Крик. К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОМ КОДЕ

653

XI

Ф. Жакоб. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

660

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

675

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

699

Ирвин Гершкович

Г Е Н Е Т И К А

*Утверждено к печати Научным советом
по проблемам генетики и селекции
Академии наук СССР*

Редакторы В. И. Самойлов, Ф. Б. Шапир
Редактор издательства Э. А. Фролова
Художник Н. Б. Старцев
Технический редактор Ю. В. Рылина

Сдано в набор 26/III 1968 г. 1-е издание
к печати 6/XI 1968 г. Формат 7 × 11
Усл. печ. л. 63,52 Уч.-изд. л. 58,8 Бумага А
Тираж 20000 экз. Тип. зак. № 199
Цена 4 р. 40 к.

Издательство «Наука».
Москва К-62, Подсосенский пер., 21

2-я типография издательства «Наука»
Москва Г-99, Щубинский пер., 10

ОПЕЧАТКИ

| Страница | Строка | Напечатано | Должно быть |
|------------|---------|------------|------------------|
| 220 | 19 стр. | 0,00001 | $\sqrt{0,00001}$ |
| 220 | | | |
| Табл. 15—3 | 3 стр. | q_2 | q^2 |

Гершкович. Генетика

ПОПЕЧЕНЬС

И. ГЕРШУНОВИЧ

4 р. 40 к



ГЕНЕТИКА

И. ГЕРШКОВИЧ